

CAMILE LUGARINI

**ISOLAMENTO DE *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS* A PARTIR DE EXCRETAS DE
PASSERIFORMES E PSITTACIFORMES NO ESTADO DO PARANÁ**

**Dissertação apresentada como requisito parcial
à obtenção do grau de Mestre em Ciências
Veterinárias, Curso de Pós-graduação em
Ciências Veterinárias, Setor de Ciências
Agrárias, Universidade Federal do Paraná.**

Orientador: Prof. Dr. Fabiano Montiani-Ferreira

**Co-orientadores: Prof. Marconi Rodrigues de
Farias**

**Prof^a. Marisol Dominguez
Muro**

**CURITIBA
2007**


PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

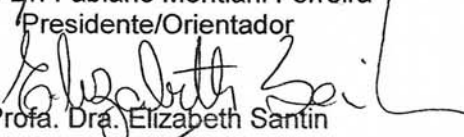


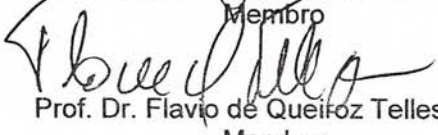
PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação intitulada "ISOLAMENTO DE *Cryptococcus neoformans* A PARTIR DE EXCRETAS DE PASSERIFORMES E PSITTACIFORMES NO ESTADO DO PARANÁ" apresentada pela Mestranda CAMILE LUGARINI, declara ante os méritos demonstrados pela Candidata, e de acordo com o Art. 78 da Resolução nº 62/03-CEPE/UFPR, que considerou a candidata Nota para receber o Título de Mestre em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Patologia Veterinária.

Curitiba, 10 de janeiro de 2007.


Prof. Dr. Fabiano Montiani Ferreira
Presidente/Orientador


Profa. Dra. Elizabeth Santin
Membro


Prof. Dr. Flavio de Queiroz Telles Filho
Membro

AGRADECIMENTOS

À UFPR, pela oportunidade de mais uma vez contar com esta instituição para a minha formação. Ao Hospital de Clínicas pela oportunidade concedida da utilização das instalações e materiais do Laboratório de Micologia.

Ao meu orientador, Prof. Fabiano Montiani-Ferreira pelo apoio e oportunidade.

Aos meus co-orientadores, Prof. Marconi Rodrigues de Farias, idealizador do projeto, pela orientação, apoio e aprendizado obtido e Prof^a. Marisol Dominguez Muro, por todo o aprendizado fúngico dos últimos anos, colaboração, sugestões, estímulo e amizade.

À banca de qualificação e mestrado, ao Prof. Flávio de Queiroz Telles Filho e Prof^a. Elizabeth Santin, pelo tempo despendido com a correção e sugestões.

À Prof^a. Marilene Henning Vainstein, pela oportunidade, auxílio na condução deste trabalho e contribuições valiosas e a todo o pessoal do o Laboratório de Biologia de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica do CenBiot da UFRGS, especialmente Cristine Goebel, pelo auxílio, sugestões e domingos de alegria.

À Prof^a. Márcia Lazéra, do Instituto de Pesquisas Evandro Chagas da Fundação Oswaldo Cruz, pela oportunidade de estágio e conhecimentos adquiridos, além das sugestões de grande valia.

À Gisele Pesquero Fernandes, Coordenadora dos Serviços de Apoio Diagnóstico e Terapêutico do Hospital de Clínicas, pela oportunidade e correções.

À bioquímica Margareth Ono e à técnica química Any Kelli Stival, pela ajuda na sorologia. Ao pessoal do Laboratório de Análises Clínicas da PUCPR, especialmente, Prof^a. Rita Mangrich-Rocha, por todo apoio na sorologia, separação de soro e empréstimo de materiais.

Ao Prof. Ricardo Guilherme D'Otaviano de Castro Vilani pela oportunidade de utilização do CETAS para a realização da minha tese.

A todos os funcionários do Laboratório de Micologia e do Setor de Preparação de Meios e Soluções do Hospital de Clínicas, especialmente Rosângela, Cida, Adriana, Lili, Emília, Nancy, Pedro, Jô e Olívia, pela ajuda, paciência e aprendizado.

Aos residentes Salvianos B. Tramontin e Graziele C.G. Soresini, à médica veterinária Alethea P.M. de Oliveira e aos funcionários do CETAS Paulo, Preta e Seu Belmário que tanto me ajudaram nas primeiras etapas profissionais da minha vida. Aos estagiários, especialmente Henrique e André que não pouparam esforços ou feriados para me acompanharem ao CETAS.

Ao Maurício Cichon, Larissa Anuska Zeni Condas e Elise Thoms pelo auxílio em todas as etapas do trabalho e tudo o que proporcionaram.

Aos novos colegas do Centro de Biotecnologia do RS e à nova família que encontrei no Rio Grande do Sul, Lísia, Nenê, Luisa, Ricardo e Raquel, pelo auxílio e amizade.

Aos proprietários e funcionários dos Aviários de Curitiba, de onde foram obtidas as amostras de excretas.

Ao pessoal do Vida Livre, que não pode faltar nos meus agradecimentos. Por toda amizade e apoio durante esta fase da vida.

A minha família, pelo apoio e carinho constantes.

Aos meus amigos, a quem devo minhas horas de alegria e descontração, entre os momentos estressantes do mestrado. A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

A Fundação Araucária e CAPES, pelo auxílio financeiro. Ao IBAMA, pela aprovação do projeto no CETAS PUCPR/IBAMA, além da amizade com os funcionários.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	ii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	vi
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, SÍMBOLOS E UNIDADES	ix
LISTA DE NOMES COMUNS E CIENTÍFICOS	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	4
2.1 OBJETIVO GERAL.....	4
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
3 REVISÃO DE LITERATURA	5
3.1 HISTÓRICO.....	5
3.1.1 Histórico da Doença em Animais.....	6
3.2 ASPECTOS MORFOBIOQUÍMICOS DE <i>C. neoformans</i> E <i>C. gattii</i>	7
3.3 CICLO DE VIDA DE <i>C. neoformans</i> E <i>C. gattii</i>	8
3.4 ASPECTOS MOLECULARES DE <i>C. neoformans</i> E <i>C. gattii</i>	10
3.5 VIAS DE INFECÇÃO.....	12
3.6 EPIDEMIOLOGIA DE <i>C. neoformans</i> E <i>C. gattii</i>	13
3.7 ECOLOGIA DE <i>C. neoformans</i> E <i>C. gattii</i>	16
3.8 ASPECTOS CLÍNICOS EM SERES HUMANOS.....	22
3.9 ASPECTOS LABORATORIAIS.....	23
3.10 CRIPTOCOCOSE EM ANIMAIS.....	24
3.10.1 Criptococose em Aves.....	26
4 MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 ORIGEM DAS AMOSTRAS E LOCAIS DE COLETA.....	28
4.2 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS E ISOLAMENTO DA LEVEDURA.....	30
4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS.....	32
4.3.1 Caracterização Morfológica e Bioquímica.....	33
4.3.1.1 Micromorfologia.....	33
4.3.1.2 Atividade fenoloxidase.....	33
4.3.1.3 Hidrólise da uréia.....	33
4.3.1.4 Termotolerância à 37°C.....	34
4.3.1.5 Sensibilidade à cicloheximida.....	34
4.3.1.6 Assimilação de carboidratos e nitrogênio.....	34
4.3.1.7 Quimiotipagem.....	35
4.3.2 Aglutinação de partículas em látex.....	35
4.3.3 Caracterização Molecular.....	36
4.3.3.1 Extração do DNA.....	36
4.3.3.2 PCR <i>multiplex</i>	37
4.3.3.3 PCR <i>fingerprinting</i>	37
4.3.3.4 Determinação do tipo reprodutivo.....	38
4.4 AMOSTRAS CLÍNICAS.....	39
4.5 PRESERVAÇÃO DOS ISOLADOS.....	39
4.6 ANTIGENEMIA EM PSITTACIFORMES.....	39
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
5 RESULTADOS	42

5.1 ISOLAMENTO DE <i>C. neoformans</i> A PARTIR DE EXCRETAS, CLOACA E INGLÚVIO DE PASSERIFORMES E PSITTACIFORMES.....	42
5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS DE EXCRETA DE PASSERIFORMES E PSITTACIFORMES.....	51
5.2.1 Caracterização Morfológica, Bioquímica e Sorológica dos Isolados.....	51
5.2.2 Caracterização Molecular dos Isolados.....	53
5.3 EPIDEMIOLOGIA E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E MOLECULAR DOS ISOLADOS CLÍNICOS.....	55
5.4 ANTIGENEMIA EM PSITTACIFORMES.....	56
6 DISCUSSÃO	58
7 CONCLUSÕES	70
REFERÊNCIAS	71
ANEXOS	89

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 –	ESQUEMA REPRESENTATIVO DO CICLO DE VIDA DE <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> . A) FUSÃO DE DUAS CÉLULAS MAT COMPLEMENTARES E FORMAÇÃO DA HIFA DICARIÓTICA. B) CARIOGAMIA. C) MEIOSE E ESPORULAÇÃO.....	9
FIGURA 2 –	FOTOGRAFIA DA FACHADA FRONTAL DO CETAS PUCPR/IBAMA, DE ONDE FORAM OBTIDAS AMOSTRAS DE PASSERIFORMES E PSITTACIFORMES.....	29
MAPA 1 –	LOCALIZAÇÃO DOS MUNICÍPIOS DE CURITIBA E TIJUCAS DO SUL/PR EM RELAÇÃO AO MAPA DO BRASIL.....	29
FIGURA 3 –	FOTOGRAFIAS ILUSTRANDO O PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE EXCRETA DE PASSERIFORMES E PSITTACIFORMES EM FLUXO LAMINAR. A) MATERIAIS NECESSÁRIOS PARA O PROCESSAMENTO. B) SUSPENSÃO DAS AMOSTRAS DE EXCRETA EM 40 ml DE SOLUÇÃO FISIOLÓGICA ESTÉRIL EM PROVETAS DE PLÁSTICO DE 250 ml. C) SOBRENADANTE EM TUBO CÔNICO COM TAMPAS CONTENDO 2 ml DE SOLUÇÃO COM PENICILINA CRISTALINA 1.200.000 UI (4,5 mg/ml) E ESTREPTOMICINA (10 mg/ml).....	31
FIGURA 4 –	SEQÜÊNCIA DE FOTOGRAFIAS DEMONSTRANDO A COLETA DE AMOSTRAS A PARTIR DE SWABS. A) CONTENÇÃO FÍSICA E APLICAÇÃO INTRAMUSCULAR DE MIDAZOLAM PARA A TRANQUILIZAÇÃO. B) ABERTURA DO BICO COM DUAS GAZES. C) COLETA DE AMOSTRA COM SWAB URETRAL A PARTIR DO INGLÚVIO. D) COLETA DE AMOSTRA COM SWAB URETRAL A PARTIR DA CLOACA.....	32
FIGURA 5 –	FOTOGRAFIA REPRESENTATIVA DEMONSTRANDO A COLHEITA DE SANGUE ATRAVÉS DA VEIA ULNAR OU RADIAL EM PSITTACIFORMES.....	40
GRÁFICO 1 –	HISTOGRAMA DA RELAÇÃO DO NÚMERO DE AMOSTRAS POSITIVAS, E TOTAL, DE EXCRETAS DE PASSERIFORMES E PSITTACIFORMES PROVENIENTES DO CETAS PUCPR/IBAMA E DE AVIÁRIOS DE CURITIBA.....	46
GRÁFICO 2 –	PROCEDÊNCIA DAS AVES QUE CHEGARAM AO CETAS, CUJAS EXCRETAS FORAM COLETADAS PARA POSTERIOR ISOLAMENTO DE <i>C. neoformans</i> E <i>C. gattii</i>	48
GRÁFICO 3 –	AMOSTRAS POSITIVAS E TOTAIS DE EXCRETA PASSERIFORMES E PSITTACIFORMES, CONFORME PROCEDÊNCIA DAS AVES.....	49
FIGURA 6 –	MICROMORFOLOGIA DOS ISOLADOS DE <i>C. neoformans</i> PROVENIENTES DE EXCRETAS DE PASSERIFORMES E PSITTACIFORMES.....	52
FIGURA 7 –	MACROMORFOLOGIA DOS ISOLADOS DE <i>C. neoformans</i> EM ÁGAR NÍGER, DEMONSTRANDO A ATIVIDADE FENOLOXIDASE.....	52
FIGURA 8 –	DEMONSTRAÇÃO DA PRODUÇÃO DA ENZIMA UREASE, ESPECÍFICA PARA O GÊNERO <i>Cryptococcus</i> . AMOSTRAS À DIREITA COM COLORAÇÃO RÓSEA SÃO POSITIVAS.....	52
FIGURA 9 –	AUXANOGRAMA, DEMONSTRANDO OS HALOS MACROSCÓPICOS DE CRESCIMENTO AO REDOR DE DISCOS DE AÇÚCARES.....	52
FIGURA 10 –	CULTIVO EM MEIO CGB DE ISOLADOS AMBIENTAIS. DA ESQUERDA PARA A DIREITA: CONTROLE NEGATIVO, CONTROLE POSITIVO E AMOSTRA PROVENIENTE DE EXCRETAS.....	52
FIGURA 11 –	AGLUTINAÇÃO EM LÁTEX PARA DETECÇÃO DE ANTÍGENOS CAPSULARES. DA ESQUERDA PARA A DIREITA, NA FILEIRA DE CIMA: CONTROLE POSITIVO, CONTROLE NEGATIVO, AMOSTRAS AMBIENTAIS (54 e 97).....	52
FIGURA 12 –	EXEMPLO REPRESENTATIVO DE AMPLIFICAÇÃO NA PCR <i>MULTIPLEX</i> UTILIZANDO OS PARES DE OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES CNA 70A E CNA 70S (ESPECÍFICOS PARA <i>C. neoformans</i>), CNB 49A E CNB 49S (ESPECÍFICOS PARA <i>C. gattii</i>). O TAMANHO MOLECULAR DAS BANDAS FORMADAS ESTÁ EVIDENCIADO NO LADO ESQUERDO DA FIGURA. DA ESQUERDA PARA DIREITA: MARCADOR MOLECULAR λ /HINDIII 564-23130pb (MM), AMOSTRA DE REFERÊNCIA WM 148 (<i>C. neoformans</i>) (CA), AMOSTRA DE REFERÊNCIA WM 161 (<i>C. gattii</i>) (CB), ISOLADOS DE EXCRETAS DE PASSERIFORMES E PSITTACIFORMES (05-65) E CONTROLE NEGATIVO (N).....	53
FIGURA 13 –	EXEMPLO REPRESENTATIVO DE AMPLIFICAÇÃO DA PCR <i>FINGERPRINTING</i> EM AMOSTRAS AMBIENTAIS E CLÍNICAS DE <i>C. neoformans</i> , UTILIZANDO A SEQÜÊNCIA MINISSATÉLITE M13. ESQUERDA PARA DIREITA: MARCADOR MOLECULAR λ /HINDIII 564-23130pb (MM), AMOSTRA DE REFERÊNCIA WM 148 (C.	

- neoformans*, SOROTIPO A, VNI) (A), AMOSTRA DE REFERÊNCIA WM 161 (*C. gattii*, VGIII) (B), ISOLADOS DE EXCRETAS DE PASSERIFORMES E PSITTACIFORMES (02-37), AMOSTRAS CLÍNICAS (309-318) E CONTROLE NEGATIVO (N).....54
- FIGURA 14 – EXEMPLO REPRESENTATIVO DE AMPLIFICAÇÃO DA PCR *FINGERPRINTING* EM AMOSTRAS AMBIENTAIS E CLÍNICAS DE *C. neoformans* E *C. gattii*, UTILIZANDO A SEQUÊNCIA MICROSSATÉLITE (GACA)₄. ESQUERDA PARA DIREITA: MARCADOR MOLECULAR λ /HINDIII 564-23130pb (MM), AMOSTRA DE REFERÊNCIA WM 148 (*C. neoformans*, SOROTIPO A, VNI) (A), AMOSTRA DE REFERÊNCIA WM 179 (*C. gattii*, VGI) (B), ISOLADOS DE EXCRETAS DE PASSERIFORMES E PSITTACIFORMES (118-157), AMOSTRAS CLÍNICAS (324-335) E CONTROLE NEGATIVO (N).....54
- FIGURA 15 – EXEMPLO REPRESENTATIVO DE AMPLIFICAÇÃO DA PCR PARA DETERMINAÇÃO DO TIPO REPRODUTIVO EM AMOSTRAS AMBIENTAIS E CLÍNICAS DE *C. neoformans*, COM OS PARES DE OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES $\alpha 1$ E $\alpha 2$, ESPECÍFICOS PARA MAT α , E $a 1$ E $a 2$, ESPECÍFICOS PARA MAT a , QUE AMPLIFICAM PRODUTOS DE 101pb E 117pb, RESPECTIVAMENTE. O TAMANHO MOLECULAR DAS BANDAS FORMADAS ESTÁ EVIDENCIADO NO LADO ESQUERDO DA FIGURA. DA ESQUERDA PARA DIREITA: ISOLADOS DE EXCRETAS DE PASSERIFORMES E PSITTACIFORMES (133-148), ISOLADO CLÍNICO (326) E MARCADOR MOLECULAR 100pb (Invitrogen) (MM).....55
- FIGURA 16 – FOTO DEMONSTRATIVA DA AGLUTINAÇÃO EM LÁTEX PARA DETECÇÃO DE ANTÍGENOS CAPSULARES NO SORO DE PSITTACIFORMES. 1) CONTROLE POSITIVO; 2) CONTROLE NEGATIVO; 3-8) AMOSTRAS DE SORO APRESENTANDO UMA SUSPENSÃO HOMOGÊNEA DE PARTÍCULAS SEM A VISUALIZAÇÃO DE FORMAÇÃO DE GRUMOS APÓS A MISTURA COM O LÁTEX, SENDO CONSIDERADAS NEGATIVAS.....57

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – AMOSTRAS DE EXCRETA PROVENIENTES DE GAIOLAS CONTENDO SOMENTE UMA ESPÉCIE DE PASSERIFORME, DO CETAS PUCPR/IBAMA E DE AVIÁRIOS DE CURITIBA, EVIDENCIANDO O NÚMERO DE AMOSTRAS COLETADAS DE CADA ESPÉCIE.....	43
TABELA 2 – AMOSTRAS DE EXCRETA PROVENIENTES DE GAIOLAS CONTENDO SOMENTE UMA ESPÉCIE DE PSITTACIFORME, DO CETAS PUCPR/IBAMA E AVIÁRIOS DE CURITIBA, EVIDENCIANDO O NÚMERO DE AMOSTRAS COLETADAS DE CADA ESPÉCIE.....	43
TABELA 3 – AMOSTRAS DE EXCRETA PROVENIENTES DE GAIOLAS COLETIVAS DE PASSERIFORMES E PSITTACIFORMES COLETADAS NO CETAS PUCPR/IBAMA E AVIÁRIOS DE CURITIBA, EVIDENCIANDO AS ESPÉCIES CONTIDAS EM CADA GAIOLA E O LOCAL DE COLETA.....	44
TABELA 4 – AMOSTRAS POSITIVAS PARA <i>C. neoformans</i> PROVENIENTES DE EXCRETAS ORIUNDAS DE GAIOLAS DE PASSERIFORMES E PSITTACIFORMES DO CETAS PUCPR/IBAMA E AVIÁRIOS DE CURITIBA.....	45
TABELA 5 – RESUMO DOS DADOS DE RELEVÂNCIA OBTIDOS NO PRESENTE ESTUDO.....	47
TABELA 6 – AMOSTRAS COLETADAS A PARTIR DA CLOACA DE PASSERIFORMES E PSITTACIFORMES PROVENIENTES DO CETAS PUCPR/IBAMA, EVIDENCIANDO O NÚMERO DE AMOSTRAS DE CADA ESPÉCIE E A ORDEM A QUE PERTENCEM....	50
TABELA 7 – AMOSTRAS COLETADAS A PARTIR DO INGLÚVIO DE PASSERIFORMES E PSITTACIFORMES PROVENIENTES DO CETAS PUCPR/IBAMA, EVIDENCIANDO O NÚMERO DE AMOSTRAS DE CADA ESPÉCIE E A ORDEM A QUE PERTENCEM.....	51
TABELA 8 – AMOSTRAS CLÍNICAS HUMANAS PROVENIENTES DA MICOTECA DO LABORATÓRIO DE MICOLOGIA, SETOR DE MICROBIOLOGIA, HOSPITAL DE CLÍNICAS, UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, UTILIZADAS PARA COMPARAÇÃO MOLECULAR COM AMOSTRAS AMBIENTAIS DE EXCRETAS DE AVES, EVIDENCIANDO O NÚMERO DA AMOSTRA, SEXO E IDADE DO INDIVÍDUO, FATOR PREDISPONENTE (FP), MATERIAL DE ONDE FOI OBTIDO O ISOLADO, RESULTADO DO CGB, PCR <i>multiplex</i> (MUL), PCR <i>fingerprinting</i> (FIN) e <i>mating type</i> (MAT).....	56
TABELA 9 – AMOSTRAS DE SANGUE PROVENIENTES DE PSITTACIFORMES DO CETAS PUCPR/IBAMA, EVIDENCIANDO O NÚMERO DE AMOSTRAS OBTIDA DE CADA ESPÉCIE.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

%	-	por cento
°	-	grau
°C	-	grau Celsius
μl	-	microlitro
AFPL	-	polimorfismo de tamanho de fragmentos amplificados - <i>amplified fragment length polymorphism</i>
aids	-	síndrome da imunodeficiência adquirida - <i>acquired immunodeficiency syndrome</i>
CETAS	-	Centro de Triagem de Animais Silvestres
CGB	-	ágar canavanina-glicina-azul de bromotimol
DNA	-	ácido desoxirribonucleico
dNTP	-	desoxirribonucleosídeo(s) trifosfato(s)
EDTA	-	ácido etileno-diamino-tetra-acético
g	-	grama
h	-	hora
IAP	-	Instituto Ambiental do Paraná
IBAMA	-	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Renováveis
HCl	-	ácido clorídrico
HIV	-	vírus da imunodeficiência humana – <i>human immunodeficiency virus</i>
IM	-	intramuscular
KCl	-	cloreto de potássio
kg	-	quilograma
KH ₂ PO ₄	-	fosfato de potássio monobásico
km	-	quilômetros
km ²	-	quilômetros quadrados
KNO ₃	-	nitrato de potássio
l	-	litro
LCR	-	Líquido cefalorraquidiano
m	-	metros
M	-	molar
MS	-	Mato Grosso do Sul
MAT	-	tipos de reação sexual - <i>mating types</i>
mg	-	miligrama
MgCl ₂	-	cloreto de magnésio
MgSO ₄	-	sulfato de magnésio
min	-	minutos
ml	-	mililitro
mm	-	milímetro
mM	-	milimol
NaCl	-	cloreto de sódio
NaOH	-	hidróxido de sódio
ng	-	nanograma
pb	-	pares de bases
PCR	-	reação em Cadeia pela Polimerase – <i>polymerase chain reaction</i>
pH	-	potencial hidrogeniônico
PLB1	-	fosfolipase 1

pmol	-	picomol
PR	-	Paraná
PUCPR	-	Pontifícia Universidade Católica do Paraná
qsp	-	quantidade suficiente para
RAPD	-	DNA polimórfico amplificado ao acaso - <i>random amplified polymorphic DNA</i>
RENCTAS	-	Rede Nacional de Combate ao Tráfico de Animais Silvestres
RFLP	-	análise de fragmentos de DNA gerados por enzimas de restrição - <i>restriction fragment length polymorphism</i>
RNAse	-	ribonuclease
rpm	-	rotações por minuto
RS	-	Rio Grande do Sul
s	-	segundos
SDS	-	dodecilsulfato de sódio
SNC	-	sistema nervoso central
sp.	-	espécie
spp.	-	espécies
TE	-	Tris-EDTA
TENTS	-	TrisHCl-EDTA-NaCl-Triton X-100-SDS
Tris	-	2-amino-2-hidroximetilpropano-1,3-diol
U	-	unidade de atividade enzimática
UI	-	unidades Internacionais
UFPR	-	Universidade Federal do Paraná
UFRGS	-	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
URA5	-	ortidina monofosfato pirofosfolirase
V	-	volt
var.	-	variedade

LISTA DE NOMES COMUNS E CIENTÍFICOS

NOME COMUM	NOME CIENTÍFICO	ORDEM	CLASSE
	<i>Sporophila</i> sp.	Passeriforme	Aves
Agapornis	<i>Agapornis</i> sp.	Psittaciforme	Aves
Águia-de-asa-redonda	<i>Buteo buteo</i>	Falconiforme	Aves
Arara-canindé	<i>Ara ararauna</i>	Psittaciforme	Aves
Avoante	<i>Zenaida auriculata</i>	Columbiforme	Aves
Azulão	<i>Passerina brissonii</i>	Passeriforme	Aves
Baiano	<i>Sporophila nigricollis</i>	Passeriforme	Aves
Bico-de-lacre-comum	<i>Estrilda astrild</i>	Passeriforme	Aves
Bigodinho	<i>Sporophila lineola</i>	Passeriforme	Aves
Boi	<i>Bos taurus</i>	Artiodactyla	Mammalia
Cabrito	<i>Capra hircus</i>	Artiodactyla	Mammalia
Cacatua	<i>Cacatua alba</i>	Psittaciforme	Aves
Cais-cais	<i>Euphonia chalybea</i>	Passeriforme	Aves
Calafate	<i>Padda oryzivora</i>	Passeriforme	Aves
Calopsita	<i>Nymphicus hollandicus</i>	Psittaciforme	Aves
Camundongo	<i>Mus musculus</i>	Rodentia	Mammalia
Canário-belga	<i>Serinus canarius</i>	Passeriforme	Aves
Canário-da-terra-verdadeiro	<i>Sicalis flaveola</i>	Passeriforme	Aves
Canário-do-reino	<i>Corduelis coccyzoides</i>	Passeriforme	Aves
Cão	<i>Canis familiaris</i>	Carnivora	Mammalia
Cardeal	<i>Paroaria coronata</i>	Passeriforme	Aves
Caturrita	<i>Myiopsitta monachus</i>	Psittaciforme	Aves
Cavalo	<i>Equus caballus</i>	Perysodactyla	Mammalia
Cervo	<i>Cervus elaphus</i>	Artiodactyla	Mammalia
Chauá	<i>Amazona rhodocorytha</i>	Psittaciforme	Aves
Chopim	<i>Moluthrus banariensis</i>	Passeriforme	Aves
Cigarra-bambú	<i>Haplospiza unicolor</i>	Passeriforme	Aves
Cigarra-verdadeira	<i>Sporophila falcirostris</i>	Passeriforme	Aves
Coala	<i>Phascolarctos cinereus</i>	Marsupialia	Mammalia
Coleirinho	<i>Sporophila caerulescens</i>	Passeriforme	Aves
Cuiú-cuiú	<i>Pionopsitta pileata</i>	Psittaciforme	Aves
Curió	<i>Oryzoborus angolensis</i>	Passeriforme	Aves
Encontro	<i>Icterus cayanensis</i>	Passeriforme	Aves
Furão	<i>Mustela putorius furo</i>	Carnívora	Mammalia
Galo-da-campina	<i>Paroaria dominicana</i>	Passeriforme	Aves
Gato	<i>Felis catus</i>	Carnivora	Mammalia
Gaturamo-verdadeiro	<i>Euphonia violacea</i>	Passeriforme	Aves
Gazela	Família Bovidae	Artiodactyla	Mammalia
Golfinho-nariz-de-garrafa	<i>Tursiops truncatus</i>	Cetacea	Mammalia
Guepardo	<i>Acinonyx jubatus</i>	Carnívora	Mammalia
Jandaia	<i>Aratinga solstitialis</i>	Psittaciforme	Aves
Kiwi	<i>Apteryx</i> sp.	Apterygiforme	Aves
Lagarteiro-peneireiro	<i>Falco tinnunculus</i>	Falconiforme	Aves
Maitaca-de-maximiliano	<i>Pionus maximiliani</i>	Psittaciforme	Aves
Mandarim	<i>Taeniopigya guttata</i>	Passeriforme	Aves
Manon	<i>Lonchura striata domestica</i>	Passeriforme	Aves
Melro	<i>Gnorimopsar chopi</i>	Passeriforme	Aves
Ovelha	<i>Ovis aries</i>	Artiodactyla	Mammalia
Papa-cacau	<i>Amazona festiva</i>	Psittaciforme	Aves
Papagaio	<i>Amazona</i> sp.	Psittaciforme	Aves
Papagaio-de-cara-roxa	<i>Amazona brasiliensis</i>	Psittaciforme	Aves
Papagaio-de-peito-roxo	<i>Amazona vinacea</i>	Psittaciforme	Aves
Papagaio-do-mangue	<i>Amazona amazonica</i>	Psittaciforme	Aves
Papagaio-moleiro	<i>Amazona farinosa</i>	Psittaciforme	Aves
Papagaio-verdadeiro	<i>Amazona aestiva</i>	Psittaciforme	Aves
Pega	<i>Pica pica</i>	Passeriforme	Aves

NOME COMUM	NOME CIENTÍFICO	ORDEM	CLASSE
Periquito-alexandrino	<i>Psittacula eupatria</i>	Psittaciforme	Aves
Periquito-australiano	<i>Melopsittacus undulatus</i>	Psittaciforme	Aves
Periquito-maracanã	<i>Aratinga leucophthalmus</i>	Psittaciforme	Aves
Periquito-rei	<i>Aratinga aurea</i>	Psittaciforme	Aves
Periquito-rico	<i>Brotogeris tirica</i>	Psittaciforme	Aves
Pichochó	<i>Sporophila frontalis</i>	Passeriforme	Aves
Pimentão	<i>Pitylus fuliginosus</i>	Passeriforme	Aves
Pintagol	Híbrido entre <i>S. canarius</i> e <i>C. magellanicus</i>	Passeriforme	Aves
Pintassilgo	<i>Carduelis magellanicus</i>	Passeriforme	Aves
Pombo-africano	<i>Columba</i> sp.	Columbiforme	Aves
Pombo-doméstico	<i>Columba livia</i>	Columbiforme	Aves
Pombo-rabo-de-leque	<i>Columba</i> sp.	Columbiforme	Aves
Porco	<i>Suis scrofa domesticus</i>	Artiodactyla	Mammalia
Porquinho-da-Índia	<i>Cavia porcellus</i>	Rodentia	Mammalia
Raposa	<i>Vulpes vulpes</i>	Carnívora	Mammalia
Rato	<i>Rattus norvegicus</i>	Rodentia	Mammalia
Rolinha	<i>Columbina talpacoti</i>	Passeriforme	Aves
Rolinha-diamante	<i>Geopelia cuneata</i>	Columbiforme	Aves
Sabiá	<i>Turdus</i> sp.	Passeriforme	Aves
Sabiá-barranco	<i>Turdus leucomelas</i>	Passeriforme	Aves
Sabiá-coleira	<i>Turdus albicollis</i>	Passeriforme	Aves
Sabiá-do-campo	<i>Mimus saturninus</i>	Passeriforme	Aves
Sabiá-ferreiro	<i>Turdus nigriceps</i>	Passeriforme	Aves
Sabiá-laranjeira	<i>Turdus rufiventris</i>	Passeriforme	Aves
Sabiá-poca	<i>Turdus amaurochalinus</i>	Passeriforme	Aves
Sabiá-uma	<i>Platycypha flavipes</i>	Passeriforme	Aves
Sagüi	<i>Callithrix</i> sp.	Primata	Mammalia
Soldado	<i>Cacicus chrysopterus</i>	Passeriforme	Aves
Tico-tico	<i>Zonotrichia capensis</i>	Passeriforme	Aves
Tico-tico-rei	<i>Coryphospingus cucullatus</i>	Passeriforme	Aves
Tiziu	<i>Votatina jacarina</i>	Passeriforme	Aves
Trinca-ferro	<i>Saltator similis</i>	Passeriforme	Aves
Vison	<i>Mustela</i> sp.	Carnívora	Mammalia

RESUMO

A criptococose é uma infecção fúngica oportunística sistêmica causada por *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii*. *C. neoformans* é constituído pelas variedades *grubii* (sorotipo A) e *neoformans* (sorotipo D), além do híbrido AD. Já *C. gattii* possui dois sorotipos, conhecidos como B e C. *C. neoformans* é encontrado no solo e nas excretas de aves, principalmente pombos e seus ninhos. Alguns estudos sugerem que excretas de Passeriformes e Psittaciformes, mantidos em cativeiro, são uma fonte potencial de contaminação dos ambientes doméstico e público por *C. neoformans*, representando mais um fator de risco para a aquisição da doença. Considerando o grande número de espécies de aves mantido em cativeiro, os objetivos deste estudo foram: 1) investigar a existência de *C. neoformans* e *C. gattii* em excretas de Passeriformes e Psittaciformes no estado do Paraná; 2) detectar os tipos molecular e reprodutivo encontrados; 3) correlacionar os isolados ambientais e clínicos; 4) isolar o agente a partir de amostras de cloaca e ingluvío, para determinar a fonte primária da levedura nas excretas, e; 5) realizar a detecção de antígenos capsulares de *Cryptococcus* spp. a partir do soro de aves. Foram obtidas 141 amostras de excretas de Passeriformes e Psittaciformes, alojados em gaiolas individuais ou coletivas, provenientes do CETAS PUCPR/IBAMA e aviários de Curitiba, Paraná, Brasil. Além disso, 119 amostras cloacais e 24 de ingluvío também foram obtidas, através de *swabs*. As amostras foram semeadas em ágar Níger e as colônias marrom-escuras resultantes, sugestivas de *C. neoformans* ou *C. gattii* foram submetidas à identificação: micro e macromorfologia, atividade fenoloxidase, sensibilidade à cicloheximida, termotolerância à 37°C, hidrólise da uréia e assimilação de carbono e nitrogênio. Para a identificação das espécies, tipos moleculares e reprodutivos foram utilizados o meio CGB, PCR, PCR *multiplex* e PCR *fingerprinting* com M13 e (GACA)₄. Para a comparação entre os isolados clínicos e ambientais foi procedida a identificação molecular de 25 amostras clínicas de seres humanos. Para a detecção de antígenos capsulares no soro de Psittaciformes, foram colhidas 29 amostras de sangue. Das amostras de excreta, 108 (76,60%) pertenciam a Passeriformes, 32 (22,69%) a Psittaciformes e 1 (0,71%) de uma gaiola com ambos. *C. neoformans* foi isolado de 34 (24,11%) amostras de Passeriformes e 2 (1,42%) de Psittaciformes, totalizando 25,53% amostras positivas. Nenhuma amostra de ingluvío, cloaca ou soro apresentou-se positiva. Todos os isolados ambientais foram considerados *C. neoformans* var. *grubii* (VNI) *mating type* α . A maioria das amostras clínicas, exceto uma (*C. gattii* VGI), pertenciam à *C. neoformans* var. *grubii* (VNI), sendo todas *mating type* α . Estes achados sugerem que excretas de Passeriformes e Psittaciformes podem ser um reservatório de *C. neoformans* no ambiente, sendo importantes, no aspecto zoonótico, para indivíduos imunocomprometidos. Além disso, evidencia-se que *C. neoformans* não é um fungo endosaprobótico do aparelho digestório de Passeriformes e Psittaciformes.

Palavras-chave: criptococose; levedura; excreta de aves; *C. neoformans*.

ABSTRACT

Cryptococcosis is a systemic opportunistic fungal infection caused by *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii*. *C. neoformans* is constituted by variety *grubii* (serotype A) and *neoformans* (serotype D), as well as AD hybrid. *C. gattii* has two serotypes, known as B and C. *C. neoformans* is found in the soil and avian droppings, especially pigeon excreta and their nests. Some studies report that excreta of Passerine and Psittacine birds kept in captivity can serve as a potential source for contamination of houses and public environment by *C. neoformans* representing a risk factor to develop the disease. Considering the large number of bird species kept in captivity the objectives of this study were: 1) investigate the presence of *C. neoformans* and *C. gattii* in captive bird excreta in the Paraná State; 2) investigate the molecular and mating types found in this material; 3) correlate the environmental with clinical isolates; 4) isolate the agent from cloacal and crop samples to determine primary source of the yeast in the excreta; 5) perform *Cryptococcus* antigen detection in serum birds. One hundred forty one samples of Passerine and Psittacine excreta were collected from individual and group cages from CETAS PUCPR/IBAMA and aviaries in the city of Curitiba, Paraná, Brazil. Additionally 119 cloacal samples and 24 crop samples were obtained using swabs. Samples were spread onto birdseed agar medium and the resulting dark brown colonies suggesting *C. neoformans* or *C. gattii* were submitted for identification: micro and macromorphological analysis, ability to produce melanin in birdseed agar, cycloheximide sensitivity, thermololerance at 37°C, urease production and carbon and nitrogen assimilation profile. For the identification of the species, molecular and mating types, growth in CGB medium, PCR, multiplex PCR as well as PCR fingerprinting with M13 and (GACA)₄ were performed. For the comparison between clinical and environmental isolates, molecular identification in 25 human samples was performed. For capsular antigen detection in Psittacine serum 29 blood samples were collected. One hundred eight excreta samples (76.60%) were from Passerine, 32 (22.69%) from Psittacine birds and one (0.71%) from a cage with both. *C. neoformans* was isolated from 34 (24.11%) Passerine samples and two (1.42%) Psittacine samples, totalizing 25.53% positive samples. None of the cloacal, crop or serum samples were positive. All excreta isolates were considered *C. neoformans* var. *grubii* (VNI) mating type α . Almost all clinical samples, except one (*C. gattii* VGI), were classified as *C. neoformans* var. *grubii* (VNI). All clinical samples were mating type α . These findings suggest that the excreta of Psittacine and Passerine birds can be a reservoir of *C. neoformans* in domestic and public environments and is of zoonotic importance to immunocompromised patients. The results suggest that *C. neoformans* is not an endosaprobic fungi from digestive system of Passerine and Psittacine birds.

KEY-WORDS: cryptococcosis, yeast, bird excreta, *C. neoformans*.

1 INTRODUÇÃO

A criptococose é uma infecção fúngica sistêmica, predominantemente oportunística, causada pela levedura encapsulada *Cryptococcus neoformans*, a qual possui tropismo pelo sistema nervoso central (SNC), respiratório e tegumentar. O comprometimento da resposta imune é o principal fator predisponente para a ocorrência da doença, sendo os pacientes com doenças imunodepressoras como a síndrome da imunodeficiência adquirida (aids), neoplasias linfoproliferativas ou sarcomas, sob tratamento imunossupressor ou transplantados, mais suscetíveis à doença (KNOW-CHUNG e BENNETT, 1992; MITCHELL e PERFECT, 1995; CASADEVALL e PERFECT, 1998; DARZÉ *et al.*, 2000; PAPPALARDO e MELHEM, 2003).

Baseando-se em antígenos específicos da cápsula mucopolissacarídea, *C. neoformans* foi dividido em três variedades e cinco sorotipos, sendo o sorotipo A pertencente à variedade *grubii* (FRANZOT *et al.*, 1999), o sorotipo D à variedade *neoformans*, e B e C à variedade *gattii* (FRANZOT *et al.*, 1999; SORRELL, 2001). Sob essa classificação, a designação correta para o sorotipo AD ainda não foi definida (LENGELER *et al.*, 2001), entretanto alguns autores o consideram híbrido (BOEKHOUT *et al.*, 2001). As variedades apresentam diferenças fenotípicas, genotípicas, bioquímicas, epidemiológicas e clínicas (CASALI *et al.*, 2001; SORREL, 2001).

Recentemente, com base em dados de subtipagem, seqüenciamento de nucleotídeos e análise filogenética, foi sugerida a reclassificação de *C. neoformans* var. *gattii* como uma nova espécie, *C. gattii* (BOEKHOUT *et al.*, 2001; KNOW-CHUNG *et al.*, 2002). No presente texto, para facilitar a compreensão, serão utilizadas as duas espécies: *C. neoformans*, incluindo as variedades *grubii* (sorotipo A), *neoformans* (sorotipo D) e o sorotipo AD e *C. gattii* correspondendo à *C. neoformans* var. *gattii*, sorotipos B e C.

C. neoformans pode ser encontrado em várias fontes ambientais, entretanto, relaciona-se essa espécie, na maioria das vezes, com excretas acumuladas de aves, principalmente pombos-domésticos (GRANADOS e CASTAÑEDA, 2005; KOBAYASHI *et al.*, 2005). Já *C. gattii* está relacionado ao eucalipto (ELLIS e

PFEIFFER, 1990) e ocos de várias espécies de árvores em biodegradação (LAZÉRA *et al.*, 1998, 2000; GRANADOS e CASTAÑEDA, 2005).

Devido à alta concentração de *C. neoformans* nas excretas de aves, a alta prevalência de aves em áreas urbanas, a recuperação de *C. neoformans* do ar em locais com acúmulo de excretas de aves e a severidade da criptococose em seres humanos, existe um crescente interesse na relação entre as aves, suas excretas e a criptococose humana (CASADEVALL e PERFECT, 1998; CASALI *et al.*, 2001).

Alguns estudos demonstram que aves mantidas em cativeiro como animais de estimação, especialmente Passeriformes e Psittaciformes, também podem ser responsáveis pela manutenção de *C. neoformans* no ambiente, favorecendo a aquisição da doença (PASSONI *et al.*, 1998; NOSANCHUK *et al.*, 2000; FILIÚ *et al.*, 2002; ABEGG *et al.*, 2006).

A manutenção de animais selvagens ou exóticos em cativeiro é um aspecto cultural relevante no país, sendo os Passeriformes e Psittaciformes muito populares como animais de estimação. Grande parte das espécies provém do comércio ilegal e é mantida em condições inadequadas (RENCTAS, 2001), as quais favorecem o crescimento de *Cryptococcus* spp. no ambiente domiciliar e peridomiciliar (FILIÚ *et al.*, 2002).

Desde que *Cryptococcus* spp. foi isolado pela primeira vez, há 113 anos, muitos trabalhos foram realizados, porém há muitos aspectos clínico-epidemiológicos e ecológicos desconhecidos, especialmente no Brasil. Quanto à epidemiologia do agente, ocorre grande heterogeneidade de distribuição dos sorotipos e variedades em diferentes países e regiões de um mesmo país (NISHIKAWA *et al.*, 2003).

O número de casos no estado do Paraná é expressivo e crescente a cada ano. Somente no Laboratório de Micologia do Setor de Microbiologia, no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná¹¹, foram registrados no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2005, 121 casos de criptococose (média de 20,17 casos por ano), sendo que 95,87% eram causados por *C. neoformans*¹². Esse hospital atende pacientes provenientes de Curitiba e de municípios adjacentes e a

¹¹ Curitiba, PR, Brasil

¹² Resultado negativo no meio canavanina-glicina-bromotimol (CGB)

alta incidência da doença evidencia a presença de propágulos infectantes na área urbana e rural do estado do Paraná.

No estudo da criptococose, é importante o conhecimento e a vigilância extensiva dos reservatórios e fontes de infecção (NIGRO *et al.*, 1987), fornecendo, assim, dados epidemiológicos para a implantação de programas de prevenção e terapia efetivas (HORTA *et al.*, 2002).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste estudo foi avaliar a participação das aves de estimação na ecoepidemiologia da criptococose, determinando se os Passeriformes e Psittaciformes podem contribuir na manutenção e propagação de *C. neoformans* e *C. gattii* no ambiente, representando, assim, mais um fator de risco para a aquisição da criptococose.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos foram:

a) Verificar se as excretas de Passeriformes e Psittaciformes, acumuladas em seus recintos ou gaiolas são passíveis de isolamento de *C. neoformans* e *C. gattii*;

b) Verificar a existência de *C. neoformans* e *C. gattii* no inglúvio e na cloaca de Passeriformes e Psittaciformes, determinando a fonte primária desta levedura;

c) Evidenciar a possível predileção da levedura pela excreta de alguma espécie de ave;

d) Diferenciar *C. neoformans* de *C. gattii* por meio da quimiotipagem e da PCR *multiplex*;

e) Observar o tipo molecular predominante e suas relações epidemiológicas por meio da PCR *fingerprinting* com o uso de mini e microssatélites;

f) Identificar o tipo reprodutivo de cada isolado por meio da PCR;

g) Investigar se há semelhanças moleculares entre o isolamento do agente em amostras de excreta de Passeriformes e Psittaciformes e isolados clínicos provenientes de infecções em seres humanos;

h) Realizar a detecção de antígenos capsulares de *C. neoformans* e *C. gattii* a partir do soro de Psittaciformes, para a avaliação a capacidade de invasão sistêmica de *C. neoformans* e *C. gattii* nessas aves.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 HISTÓRICO

A primeira descrição da criptococose foi realizada por Busse em 1894, por meio da identificação de um corpúsculo redondo-ovalado causador de lesão semelhante a um sarcoma na tíbia de uma paciente, a qual morreu, subsequente, em decorrência de doença disseminada. No mesmo ano, Sanfelice isolou a mesma levedura encapsulada a partir do suco de pêssego, chamando-a de *Saccharomyces neoformans*. Posteriormente, os termos *C. hominis* e *C. neoformans* foram designados para acomodar os isolados de Busse e Sanfelice, respectivamente, pois essas leveduras careciam de fermentação de carboidratos e formação de ascósporos, que são características marcantes do *Saccharomyces* spp. (KWON-CHUNG e BENNETT, 1992; MITCHELL e PERFECT, 1995).

Após a observação da levedura na meninge humana, descreveu-se a doença como uma tuberculose, pelos achados do agente em cistos gelatinosos. Com o reconhecimento de mais dois casos dessa meningite, o agente etiológico foi chamado de *Torula histolytica*, o que deu o nome da doença de torulose até os anos 50. O nome dado à espécie veio de um erro de observação dos autores, que achavam que a cápsula mucopolissacarídea era uma ação histolítica do fungo no hospedeiro (KWON-CHUNG e BENNETT, 1992).

Os anos 50 foram importantes para o estabelecimento do nome da doença como criptococose e a renomeação da levedura, que passou a ser chamada *C. neoformans*, reduzindo a confusão causada pelas terminologias anteriores. Nesta década também se evidenciou o nicho de *C. neoformans* no solo, ninhos e excretas de pombos (KWON-CHUNG e BENNETT, 1992).

Anteriormente à era da aids, a criptococose era considerada uma doença esporádica, relacionada, geralmente, com uma deficiência na imunidade celular, ocorrendo em um pequeno percentual da população (KNOW-CHUNG e BENNETT, 1992). A partir dos anos 80, com o advento da pandemia da aids e da utilização de fármacos imunossupressores, houve um incremento na incidência da criptococose, sendo essa, atualmente, a infecção fúngica de maior prevalência mundial

(ROZENBAUM e GONÇALVES, 1994; FRANZOT *et al.*, 1997; CALVO *et al.*, 2001; PAPPALARDO e MELHEM, 2003).

Apesar dos avanços obtidos após anos de pesquisa, ainda hoje não existe uma concordância taxonômica entre os autores e, após a consagração da utilização das técnicas moleculares, muitas proposições de nomenclatura vêm surgindo e se modificando ao longo dos anos (KNOW-CHUNG *et al.*, 2002). Essas leveduras, atualmente, são pertencentes à Ordem Tremellales dos Himenomicetos, um grupo de fungos que possui ocorrência natural em substrato relacionado à madeira (BOEKHOUT *et al.*, 2001).

No Brasil, os primeiros relatos da doença ocorreram nos anos de 1941 e 1944, descritos por Carlos da Silva Lacaz e Floriano de Almeida (PAPPALARDO e MELHEM, 2003). A partir de então, vários estudos epidemiológicos foram e estão sendo realizados no país (LACAZ e RODRIGUES, 1983; ROZEMBAUM *et al.*, 1992; ROZEMBAUM e GONÇALVES, 1994; AOKI *et al.*, 1999; CALVO *et al.*, 2001; HORTA *et al.*, 2002; OHKUSU *et al.*, 2002; FERNANDES *et al.*, 2003; NISHIKAWA *et al.*, 2003; IGREJA *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2004; DELGADO *et al.*, 2005).

3.1.1 Histórico da Doença em Animais

Sanfelice também foi responsável pelo primeiro isolamento de *Cryptococcus* sp. em animais, sendo realizado em 1895, a partir dos linfonodos de um boi. Em 1901, Vuillemin e Klein isolaram o agente de uma lesão pulmonar de porco e do leite. O primeiro caso descrito em eqüinos deu-se no ano seguinte, com a observação da levedura em uma massa mixomatosa pulmonar (JUNGGERMAN e SCHWARTZMAN, 1972).

Os casos de criptococose em animais foram relatados esporadicamente até os anos 50. Somente em 1952 foi descrito o primeiro caso em gatos e no ano seguinte o primeiro em cães. Nesta época, já se discutia a origem da infecção no SNC de animais de companhia. Enquanto alguns autores relatavam possíveis extensões de infecção criptocócica a partir da nasofaringe e do ouvido interno, o local primário de infecção continuava sendo os pulmões. Outras portas de entrada também foram evidenciadas, como as glândulas mamárias de bovinos na mastite enzoótica fúngica (JUNGGERMAN e SCHWARTZMAN, 1972).

A criptococose seguiu sendo relatada em várias espécies de mamíferos, como guepardos, sagüis, porquinhos-da-índia, ratos, camundongos, raposas, gazelas, cabritos, ovelhas, coalas, vison (JUNGERMAN e SCHWARTZMAN, 1972; MALIK *et al.*, 1995), furão (GREENLEE e STEPHENS, 1984), cervo (HAMIR *et al.*, 2002) e golfinho-nariz-de-garrafa (MILLER *et al.*, 2002).

3.2 ASPECTOS MORFOBIOQUÍMICOS DE *C. neoformans* E *C. gattii*

O gênero *Cryptococcus* é composto por aproximadamente 34 espécies de leveduras que se reproduzem assexuadamente por brotamento e apresentam as seguintes características: hidrolização de amido, assimilação de inositol, produção de urease, não fermentação de açúcares e sensibilidade à cicloheximida (MITCHELL e PERFECT, 1995; IKEDA *et al.*, 2002).

Tanto *C. neoformans* como *C. gattii* se desenvolvem *in vitro* em 36 a 72 h e produzem colônias mucóides, lisas, de coloração branca a creme, sendo o grau de mucosidade da colônia dependente da formação da cápsula mucopolissacarídea (KWON-CHUNG e BENNETT, 1992; MITCHELL e PERFECT, 1995).

A presença da cápsula mucopolissacarídea é uma característica distinta, sendo considerada importante fator de virulência, antifagocítico e imunodepressor. Aproximadamente 90% da cápsula é constituída pelos polissacarídeos glucuronoxilomanana, galactoxilomanana e manoproteína (MITCHELL e PERFECT, 1995; CASADEVALL e PERFECT, 1998; CASALI *et al.*, 2001; NISHIKAWA *et al.*, 2003). A diferença na estrutura das glucuronoxilomananas de sua parede celular permitiu a identificação dos cinco sorotipos conhecidos atualmente. O tamanho da cápsula é determinado pelo genótipo e condições de crescimento oferecidas, sendo que as leveduras mostram pequenas cápsulas quando no ambiente e cápsulas espessas durante a infecção (MITCHELL e PERFECT, 1995).

Microscopicamente, na sua forma assexuada haplóide, esses basidiomicetos aparecem como leveduras encapsuladas, arredondadas ou ovaladas de cinco a dez micrômetros, sem hifas ou pseudo-hifas, com brotamentos simples ou, raramente, múltiplos (KWON-CHUNG e BENNETT, 1992), sendo que *C. gattii* produz células mais elípticas (KNOW-CHUNG *et al.*, 2002).

C. neoformans e *C. gattii* são as únicas leveduras do gênero capazes de sintetizar melanina através da conversão de substratos hidroxibenzoicos pela atividade fenoxidase (KWON-CHUNG e BENNETT, 1992). Esse é considerado o maior fator de virulência desse agente, tendo capacidade antioxidante, que auxilia a sobrevivência no hospedeiro, sendo também responsável pela dificuldade em obtenção de sucesso na terapia (MITCHELL e PERFECT, 1995). Adicionalmente, seu crescimento a 37°C, secreção de proteinases e fosfolipases extracelulares, tipo reprodutivo, produção de urease, entre outros, contribuem para a patogenicidade do agente (MITCHELL e PERFECT, 1995; ABEGG, 2003; CASALI *et al.*, 2003).

3.3 CICLO DE VIDA DE *C. neoformans* E *C. gattii*

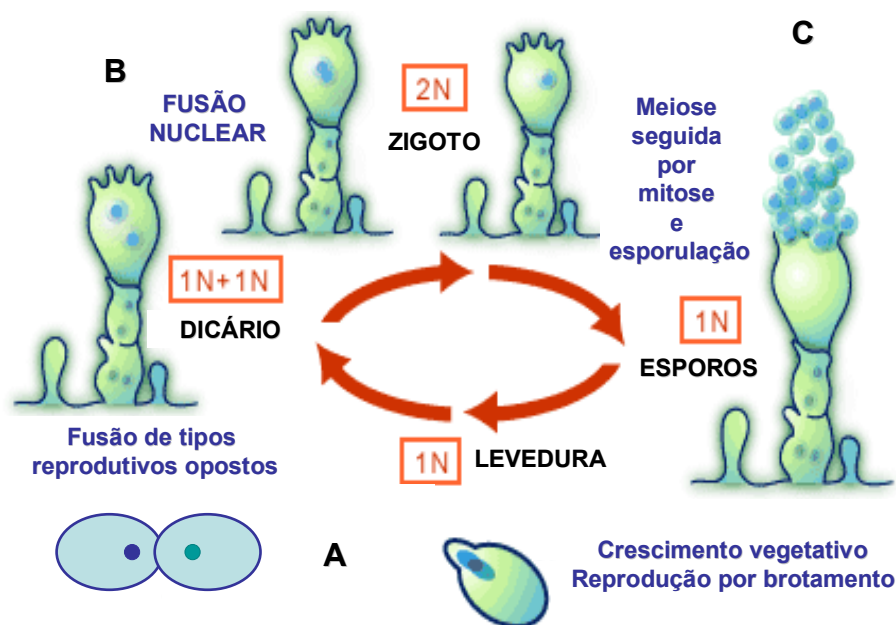
C. neoformans e *C. gattii* se reproduzem assexuadamente por brotamento, estando a grande maioria dos isolados clínicos e ambientais presentes na forma anamórfica haplóide. Apesar disso, essa levedura pode se reproduzir sexuadamente, correspondendo ao estado perfeito, sendo este estágio denominado de *Filobasidiella neoformans* e *F. bacillispora*, correspondente aos anamorfos *C. neoformans* e *C. gattii*, respectivamente (KNOW-CHUNG e BENNETT, 1992; MITCHELL e PERFECT, 1995; SORREL e ELLIS, 1997; BOEKHOUT *et al.*, 2001; CASALI *et al.*, 2001; KNOW-CHUNG *et al.*, 2002; TRILLES *et al.*, 2003).

Por serem heterotáticos, possuem dois tipos de reação sexual ou *mating types* (MAT) complementares. Ao contrário de outros basidiomicetos, as filobasidielas possuem um *locus* com dois alelos α (MAT α) e α (MAT α) (KWON-CHUNG e BENNETT, 1992; CHATURVEDI *et al.*, 2000; LENGELER *et al.*, 2001; OHKUSU *et al.*, 2002; TRILLES *et al.*, 2003). Mais de 95% dos isolados clínicos e ambientais corresponde ao MAT α (MITCHELL e PERFECT, 1995; FRANZOT *et al.*, 1997; SORREL e ELLIS, 1997; CHATURVEDI *et al.*, 2000; FORTES, 2001; OHKUSU *et al.*, 2002; PAPPALARDO e MELHEM, 2003; TRILLES *et al.*, 2003; LITVINTSEVA *et al.*, 2005; TAY *et al.*, 2005; ABEGG *et al.*, 2006).

A limitação de nutrientes e a presença de feromônios são fatores primordiais para a ocorrência de cruzamento. Quando dois isolados MAT complementares são misturados e incubados, as células leveduriformes conjugam-se e produzem hifas dicarióticas com grampos de conexão. As hifas produzem basídios terminais sub-

globosos ou clavados, onde ocorre a cariogamia, meiose, mitose e, então os basidiósporos germinam à levedura (KNOW-CHUNG e BENNETT, 1992; SORREL e ELLIS, 1997; LENGELER *et al.*, 2001).

FIGURA 1 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DO CICLO DE VIDA DE *C. neoformans* e *C. gattii*. A) FUSÃO DE DUAS CÉLULAS MAT COMPLEMENTARES E FORMAÇÃO DA HIFA DICARIÓTICA. B) CARIOGAMIA. C) MEIOSE E ESPORULAÇÃO.



FONTE: SIMMER, M.; SECKO, D.M. A peach of a pathogen. Disponível em: <<http://bioteach.ubc.ca/Biodiversity/APeachOfAPathogen/index.htm>> Acesso em: 24 ago. 2006. Modificada por Camile Lugarini.

Análises realizadas por meio da PCR com oligonucleotídeos iniciadores específicos para genes α e a , mostraram que o sorotipo AD é heterozigoto para o *locus* reprodutivo, podendo ser encontrado como aneuplóide ou diplóide, sendo resultado da reprodução dos sorotipos A MAT α e D MATa (CHATURVEDI *et al.*, 2000; BOEKHOUT *et al.*, 2001; LENGELER *et al.*, 2001).

Até hoje, a reprodução é conhecida somente *in vitro*, porém ambas as espécies de tipos de reação sexual complementares podem coexistir em um mesmo nicho, o que pode possibilitar a ocorrência de cruzamentos naturais (LAZERA *et al.*, 2000; FORTES, 2001; FRASER *et al.*, 2003; TRILLES *et al.*, 2003). BOEKHOUT *et al.* (2001) sugerem que a hibridização de *F. neoformans* e *F. bacillispora* ocorre

naturalmente, por meio de estratégias reprodutivas sexuais e parassexuais¹³. Conseqüentemente, ocorre transferência do material genético e alteração da virulência e resistência a agentes antifúngicos. Após a utilização do processo sexual *in vivo*, o fungo realiza uma subsequente expansão clonal para a sua disseminação. O que faz com que grande parte dos isolados ambientais mostre alta similaridade, sendo eles de locais vizinhos ou longínquos (FRANZOT *et al.*, 1997; TRILLES *et al.*, 2003; LITVINTSEVA *et al.*, 2005). Entretanto, isolados do mesmo nicho não são necessariamente idênticos, mas semelhantes geneticamente (TRILLES *et al.*, 2003; LITVINTSEVA *et al.*, 2005).

A determinação do fenótipo e da ploidia é importante para o entendimento da ecologia e virulência do fungo, sendo que MAT α é considerado mais virulento (KWON-CHUNG e BENNETT, 1992; MITCHELL e PERFECT, 1995; OHKUSU *et al.*, 2002). CHATURVEDI *et al.* (2000) desenvolveram um teste simples para distinguir isolados de *Cryptococcus* spp. quanto ao tipo reprodutivo, baseado nos feromônios MAT α e MATa amplificados pela PCR.

3.4 ASPECTOS MOLECULARES DE *C. neoformans* E *C. gattii*

Os estudos imunológicos são pouco sensíveis para verificar a variabilidade entre isolados, sendo que a tipagem molecular se mostra mais discriminatória, fornecendo subsídios para responder a questões relacionadas à epidemiologia, patogênese do fungo, detecção de micro-epidemias, distinção entre re-infecção e infecção primária e caracterização de linhagens resistentes a alguns fármacos (DROMER *et al.*, 1994; MITCHELL e PERFECT, 1995; CASALI *et al.*, 2001, 2003).

Os resultados de sorotipagem e tipagem molecular normalmente apresentam-se em concordância, com exceção do sorotipo AD, que muitas vezes é caracterizado como A ou D na sorotipagem e como AD nas técnicas moleculares (OLIVEIRA *et al.*, 2004).

¹³ Estratégia sexual de alguns fungos, em que os recombinantes são produzidos sem a ocorrência do processo meiótico ou ciclo sexual. Ocorre a heterocariose (núcleos de composição genética diversa em um citoplasma comum), com a posterior produção de recombinantes, permuta genética e haploidização (série de não-disjunção).

Uma variedade de técnicas tem sido utilizada para a tipificação molecular, incluindo cariotipagem, DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD - *random amplified polymorphic DNA*), análise de fragmentos de DNA gerados por enzimas de restrição (RFLP - *restriction fragment length polymorphism*), análise eletroforética em campo pulsátil, estudos de hibridização de DNA, polimorfismo de tamanho de fragmentos amplificados (AFPL - *amplified fragment length polymorphism*), reação em cadeia pela polimerase (PCR – *polymerase chain reaction*) *fingerprinting* e seqüenciamento de DNA (CURRIE *et al.*, 1994; BRANDT *et al.*, 1995, 1996; VARMA *et al.*, 1995; FRANZOT *et al.*, 1997; AOKI *et al.*, 1999; MEYER *et al.*, 1999, 2003; BOEKHOUT *et al.*, 2001; CASALI *et al.*, 2001; HORTA *et al.*, 2002; TRILLES *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2004; CHEE e LEE, 2005; DELGADO *et al.*, 2005; LITVINTSEVA *et al.*, 2005).

Todas essas técnicas têm mostrado grande heterogeneidade genética nos isolados clínicos e ambientais, podendo ser traduzida em variações fenotípicas responsáveis por aumento da virulência e resistência aos agentes terapêuticos (CASALI *et al.*, 2001).

HORTA *et al.* (2002) e CASALI *et al.* (2003) utilizaram a PCR *multiplex* para a determinação da espécie de *Cryptococcus* spp. proveniente de isolados clínicos e ambientais, com os oligonucleotídeos iniciadores CNA 70A, CNA 70S, CNB 49A e CNB 49S. AOKI *et al.* (1999) desenvolveram esses oligonucleotídeos iniciadores para a discriminação dos sorotipos A e B de *C. neoformans* e *C. gattii*, respectivamente. Entretanto, HORTA *et al.* (2002) e CASALI *et al.* (2003) observaram que esses oligonucleotídeos iniciadores podem ser utilizados somente para discernir as espécies *C. neoformans* e *C. gattii* e não para a sorotipagem.

As técnicas moleculares mais rápidas de identificação de padrões de bandas são RAPD e PCR *fingerprinting* (MITCHELL e PERFECT, 1995), sendo possível a distinção entre isolados semelhantes de uma determinada população (CHEE e LEE, 2005) ou facilitando estabelecer uma possível relação entre *C. neoformans* e *C. gattii* isolado do paciente e de fontes ambientais de infecção (CASADEVALL e PERFECT, 1998).

A PCR *fingerprinting*, técnica baseada na avaliação de bandas polimórficas formadas pela amplificação de DNA a partir de oligonucleotídeos iniciadores aleatórios, é uma das técnicas mais utilizadas na epidemiologia molecular de *C.*

neoformans e *C. gattii*, pois combina a especificidade da hibridização clássica de DNA com a rapidez e a simplicidade de uma reação da PCR. Por meio da utilização de oligonucleotídeos iniciadores simples, como o minissatélite M13 ou seqüências repetitivas simples (GACA)₄ ou (GTG)₅, e utilização de DNA de alto peso molecular, como molde, é possível amplificar seqüências de DNA hipervariáveis do fungo, sendo que os produtos resultantes variam de 500 a 2500 pares de base (pb). Essa metodologia permitiu a identificação em nível de sorotipos com sensibilidade suficiente para detectar diferenças inter e intravarietades e possibilitou a classificação dos isolados clínicos e ambientais em oito tipos moleculares (definidos pela presença de bandas específicas e reproduzíveis): VNI (variedade *grubii*, sorotipo A₁), VNII (variedade *grubii*, sorotipo A₂), VNIII (sorotipo AD), VNIV (variedade *neoformans*, sorotipo D), VGI, VGII, VGIII e VGIV (*C. gattii*, sorotipo B e C). Não foi encontrada correlação entre o sorotipo e o tipo molecular de *C. gattii* (MEYER *et al.*, 1999, 2003). Os tipos moleculares foram confirmados por RAPD (MEYER *et al.*, 1999) e, recentemente, pela análise RFLP do gene da ortidina monofosfato pirofosforilase (URA5) e da fosfolipase 1 (PLB1) (MEYER *et al.*, 2003). A elevada homologia, conseguida através do uso da alta temperatura de anelamento entre as seqüências de DNA molde e os oligonucleotídeos iniciadores possibilita a obtenção de resultados mais fidedignos e discriminatórios na PCR *fingerprinting* do que em RAPD, além de obter-se reprodutibilidade da técnica (CASADEVALL e PERFECT, 1998; MEYER *et al.*, 1999). Sendo assim, os padrões de bandas gerados a partir dos isolados se mantêm estáveis após anos de estocagem ou repiques sucessíveis. Entretanto, a otimização da técnica deve ser realizada em cada laboratório, contemplando o termociclador utilizado, condições dos ciclos e concentração de reagentes. Mesmo após a otimização da técnica pode haver alguma variação na intensidade das bandas devido a pequenas divergências nas condições da reação (MEYER *et al.*, 1999).

3.5 VIAS DE INFECÇÃO

Exceto em raros casos de criptococose cutânea primária, a infecção se dá pela inalação de partículas fúngicas presentes no ambiente (MITCHELL e PERFECT, 1995; CASADEVALL e PERFECT, 1998). Segundo SORREL e ELLIS

(1997) e CASADEVALL e PERFECT (1998), as células fúngicas dessecadas acapsuladas e/ou os basidiósporos são suficientemente pequenos (menores que cinco micrômetros de diâmetro) para deposição alveolar e início da infecção.

A alta prevalência da levedura em isolados ambientais, aliada a rara transmissão homem-homem ou animal-animal, indica que a infecção é adquirida através de fontes ambientais do fungo (MITCHELL e PERFECT, 1995; CASALI *et al.*, 2001), especialmente a partir de inalação de propágulos provindos de excretas de aves (CASADEVALL e PERFECT, 1998).

No espaço alveolar, os macrófagos fazem a linha primária de defesa. A alta prevalência de propágulos infectantes no ambiente e a baixa frequência de pessoas que se tornam infectadas ocorre devido à eficiência da imunidade celular, que contempla uma fagocitose competente nos alvéolos e promove a defesa do organismo nos indivíduos imunocompetentes (MITCHELL e PERFECT, 1995).

3.6 EPIDEMIOLOGIA DE *C. neoformans* E DE *C. gattii*

A criptococose está relacionada geralmente à infecção por *C. neoformans* e *C. gattii*, sendo raramente causada por outras espécies, incluindo *C. albidus*, *C. laurentii*, *C. curvatus*, *C. uniguttulatus* (MITCHELL e PERFECT, 1995; CASADEVALL e PERFECT, 1998).

No mundo todo, o sorotipo A é mais comumente isolado, sendo observado em até 90% dos casos, seguido pelos sorotipos B e AD, nesta seqüência (KNOW-CHUNG *et al.*, 1982; KNOW-CHUNG e BENNETT, 1984; MITCHELL e PERFECT, 1995; CASADEVALL e PERFECT, 1998; FRANZOT *et al.*, 1997, 1999; MEYER *et al.*, 1999, 2003; BOEKHOUT *et al.*, 2001; LITVINTSEVA *et al.*, 2005). Os sorotipos D e C são escassamente relatados, exceto em alguns países europeus, algumas áreas dos Estados Unidos (Califórnia e Nova Iorque) e Ásia (KWON-CHUNG e BENNETT, 1984; DROMER *et al.*, 1994, 1996; BOEKHOUT *et al.*, 2001; LITVINTSEVA *et al.*, 2005) e são considerados menos patogênicos (MITCHELL e PERFECT, 1995; CASADEVALL e PERFECT, 1998).

Enquanto *C. neoformans* possui distribuição cosmopolita e é oportunista, afetando especialmente indivíduos imunocomprometidos (ROZENBAUM e GONÇALVES, 1994; MITCHELL e PERFECT, 1995; SPEED e DUNT, 1995;

FRANZOT *et al.*, 1997; CASADEVALL e PERFECT, 1998; SORREL, 2001), *C. gattii* possui uma distribuição mais restrita, estando geralmente associado a áreas tropicais e subtropicais (ELLIS e PFEIFFER, 1990; MITCHELL e PERFECT, 1995; CASADEVALL e PERFECT, 1998; BOEKHOUT *et al.*, 2001; SORREL, 2001), porém recentemente foi relatado em uma epidemia em Vancouver, Canadá (FRASER *et al.*, 2003).

C. gattii é predominantemente patogênico, sendo conhecido como o agente primário da criptococose sistêmica, encontrado, principalmente, em pacientes imunocompetentes (ROZEMBAUM *et al.*, 1992; ROZENBAUM e GONÇALVES, 1994; CORRÊA *et al.*, 1999; FRASER *et al.*, 2003). Sua prevalência no Brasil é considerada uma das mais altas na América do Sul (KNOW-CHUNG e BENNETT, 1984; MONTENEGRO e PAULA, 2000).

No Brasil, LACAZ e RODRIGUES (1983) desenvolveram um estudo pioneiro na identificação dos sorotipos de 25 amostras clínicas e observaram que 64% delas pertenciam ao sorotipo A, seguido por B e D.

Esta predominância do sorotipo A em isolados clínicos, seguido pelo sorotipo B foi demonstrada posteriormente por outros autores (ROZEMBAUM *et al.*, 1992; ROZEMBAUM e GONÇALVES, 1994; AOKI *et al.*, 1999; CALVO *et al.*, 2001; HORTA *et al.*, 2002; OHKUSU *et al.*, 2002; FERNANDES *et al.*, 2003; NISHIKAWA *et al.*, 2003; IGREJA *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2004; DELGADO *et al.*, 2005), entretanto o sorotipo AD apresentou maior prevalência que o sorotipo D (NISHIKAWA *et al.*, 2003).

Segundo NISHIKAWA *et al.* (2003), nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil, o sorotipo A é prevalente, tanto em isolados clínicos quanto ambientais, enquanto nas regiões Norte e Nordeste o sorotipo B predomina em todos os isolados. *C. gattii* parece ser endêmico da região Nordeste, representando 62,7 a 91,2% dos casos (ROZENBAUM e GONÇALVES, 1994; LAZÉRA *et al.*, 2000; NISHIKAWA *et al.*, 2003; PAPPALARDO e MELHEM, 2003).

A criptococose ocorre em 6 a 10% dos pacientes com aids nos Estados Unidos, Europa, Austrália e América do Sul, enquanto 15 a 35% desses pacientes são acometidos pela criptococose no continente africano (MITCHEL e PERFECT, 1995). No Brasil, de acordo com dados do Ministério da Saúde, no período entre

1980 e 2002, 6% das infecções oportunistas associadas à aids foram causadas por *C. neoformans* e *C. gattii* (MINISTÉRIO DA SAUDE DO BRASIL, 2002).

A criptococose é a primeira doença oportunística observada em 23 a 45% dos pacientes com aids (MITCHELL e PERFECT, 1995; PAPPALARDO e MELHEM, 2003), sendo a quarta causa mais freqüente de infecção oportunística (CASALI *et al.*, 2001; HORTA *et al.*, 2002). A maioria dos isolados, chegando a 99%, corresponde à variedade *grubii* (KNOW-CHUNG e BENNETT, 1992; ROZENBAUM e GONÇALVES, 1994; MITCHELL e PERFECT, 1995; FRANZOT *et al.*, 1997; CASADEVALL e PERFECT, 1998; HORTA *et al.*, 2002; OHKUSU *et al.*, 2002; FERNANDES *et al.*, 2003; NISHIKAWA *et al.*, 2003; MEYER *et al.*, 2003; IGREJA *et al.*, 2004), seguida pelos sorotipos B e AD, mesmo em áreas endêmicas de *C. gattii* (ROZENBAUM *et al.*, 1992; ROZENBAUM e GONÇALVES, 1994; FERNANDES *et al.*, 2000). Entretanto, em indivíduos sem aids, o sorotipo B é mais prevalente, seguido pelo sorotipo A, AD e C (CALVO *et al.*, 1991; MITCHELL e PERFECT, 1995).

Apesar da doença ser, geralmente, decorrente de uma única cepa de *Cryptococcus* sp. (BRANDT *et al.*, 1996; FRANZOT *et al.*, 1997; MEYER *et al.*, 1999; LITVINTSEVA *et al.*, 2005), a infecção por mais de uma variedade do fungo no mesmo paciente foi relatada por MEYER *et al.* (1999), IGREJA *et al.* (2004) e LITVINTSEVA *et al.* (2005), a qual pode ser causada pela exposição a mais de uma variedade do fungo aliada à debilidade causada pelo próprio agente da doença, que secreta compostos bioquímicos, como por exemplo, a cápsula mucopolissacarídea.

Quanto à predisposição etária e sexual, a doença é mais comum em homens adultos (ROZENBAUM e GONÇALVES, 1994; MITCHELL e PERFECT, 1995; LOPES *et al.*, 1997; DARZÉ *et al.*, 2000; FERNANDES *et al.*, 2000, 2003; MEYER *et al.*, 2003; PAPPALARDO e MELHEM, 2003; LITVINTSEVA *et al.*, 2005). Curiosamente, a incidência da doença em crianças é baixa (FERNANDES *et al.*, 2000; MITCHELL e PERFECT, 1995), entretanto, no Brasil, houve um incremento nos relatos da criptococose nessa faixa etária (CORRÊA *et al.*, 1999), estando esse ligado à migração da população da área urbana para a área rural, desnutrição ou ao aumento do número de crianças imunocomprometidas (ROZENBAUM e GONÇALVES, 1994; CORRÊA *et al.*, 1999). ROZENBAUM e GONÇALVES (1994)

afirmam que a exposição ao agente ocorre quando os indivíduos ainda são jovens, havendo reativação da infecção latente na idade adulta.

A recorrência da doença em pacientes com aids, sendo ela, resultante da reativação da infecção ou, produzida por linhagens novas, é um problema crescente (CASALI *et al.*, 2001; IGREJA *et al.*, 2004). Segundo ROZENBAUM e GONÇALVES (1994), 15 a 25% dos pacientes sem aids e aproximadamente 50% dos pacientes soropositivos para o vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) podem apresentar recorrência da doença.

A criptococose geralmente está associada à alta mortalidade (TRILLES *et al.*, 2004). Segundo MITCHELL e PERFECT (1995), a mortalidade durante a terapia inicial é de 10 a 25%, e em 12 meses, é de 30 a 60%. No Brasil, a mortalidade em pacientes com criptococose, com ou sem doença predisponente, fica em torno de 40 a 66% (CALVO *et al.*, 1991; LOPES *et al.*, 1997; CORRÊA *et al.*, 1999; DARZÉ *et al.*, 2000; PAPPALARDO e MELHEM, 2003).

3.7 ECOLOGIA DE *C. neoformans* E *C. gattii*

C. neoformans e *C. gattii* podem ser encontrados em uma variedade de nichos, incluindo substratos orgânicos e habitats relacionados (construções antigas, torres de igreja, estábulos, porões, barracões e cavernas), além de excretas de aves, fezes de morcegos e baratas, ninhos de vespa, frutas, suco de fruta fermentado, microbiota intestinal de cavalo, leite, cavidade nasal e pele de cães, gatos e coalas, recintos de coelhos, buracos de tatus, solo, vegetais em decomposição e ocos de várias espécies de árvores (NIGRO *et al.*, 1987; LAZÉRA *et al.*, 1993, 1996, 2000; MALIK *et al.*, 1997; CASADEVALL e PERFECT, 1998; CONNOLLY *et al.*, 1999; PAPPALARDO e MELHEM, 2003; TRILLES *et al.*, 2003).

Recentes estudos sugerem que ocos de árvores constituem um nicho natural para as duas espécies, em colonização mista ou não. No Brasil, *C. neoformans* e *C. gattii*, em associação ou não, já foram isolados de várias espécies de árvores nativas ou exóticas, em ambientes urbano, florestal e rural, demonstrando que não há relação entre uma árvore específica e o fungo (LAZÉRA *et al.*, 1993, 1996, 1998, 2000; FORTES, 2001; TRILLES *et al.*, 2003). Além de haver colonização mista de *C.*

neoformans e *C. gattii* em árvores, CONNOLLY *et al.* (1999) e KROCKENBERGER *et al.* (2002) relataram o mesmo evento na cavidade nasal de coalas assintomáticos.

C. gattii tem uma distribuição mais restrita geograficamente (SORREL e ELLIS, 1997). O primeiro isolamento de *C. gattii* foi realizado por ELLIS e PFEIFFER (1990), no sul da Austrália em associação ao eucalipto (*Eucalyptus camaldulensis*). Posteriormente, outras espécies de eucalipto como *E. tereticornis*, *E. rudis* e *E. gomphocephala* também foram confirmados como nicho ecológico. No Brasil, LAZÉRA *et al.* (1998) encontraram altas concentrações de *C. gattii* em ocos de árvores em biodegradação, protegidos dos efeitos letais dos raios solares. Apesar de ELLIS e PFEIFFER (1990) propuserem que a formação de basidiósporos e a dispersão dos propágulos infecciosos ocorrem intensificamente durante a estação de florescimento do eucalipto, LAZÉRA *et al.* (1998, 2000) e GRANADOS e CASTAÑEDA (2005), na América do Sul, não encontraram associação entre a floração das árvores e a presença do fungo. *C. gattii* também já foi isolado a partir de excretas de aves, especificamente, Psittaciformes (ABEGG *et al.*, 2006).

Apesar de *C. neoformans* ser encontrado em várias fontes ambientais, está relacionado, na maioria das vezes, com excretas acumuladas de aves, principalmente pombos-domésticos (EMMONS, 1955; RUIZ *et al.*, 1989; SORREL e ELLIS, 1997; CHEE e LEE, 2005; GRANADOS e CASTAÑEDA, 2005; LITVINTSEVA *et al.*, 2005; QUINTERO *et al.*, 2005). As primeiras evidências da relação de *C. neoformans* e excretas de pombos foram demonstradas por EMMONS (1955) e a partir de então, são muitos os estudos levando em consideração o isolamento ambiental de *C. neoformans* a partir dessa fonte saprobiótica em várias partes do mundo, inclusive no Brasil, onde os índices de positividade variaram de 4,3% a 31,3% (SILVA e PAULA, 1963; NIGRO *et al.*, 1987; LAZÉRA *et al.*, 1993; MACHADO *et al.*, 1993; PASSONI *et al.*, 1998; MONTENEGRO e PAULA, 2000; HORTA *et al.*, 2002; CASALI *et al.*, 2003; KOBAYASHI *et al.*, 2005; SOARES *et al.*, 2005). A primeira tentativa de isolamento ambiental de *C. neoformans* e *C. gattii* no estado do Paraná foi realizada por QUEIRÓZ-TELLES *et al.* (1998), que coletaram 21 amostras de excretas de pombos-domésticos, Psittaciformes e conteúdo de ocos de árvores em Curitiba e obtiveram 5% de amostras positivas, sendo todas correspondentes a *C. neoformans* obtidas a partir de excretas de pombos-domésticos. Recentemente, CICHON (2006) obteve 11 isolados a partir de 88

amostras providas de locais que continham acúmulo de excreta de pombos em Curitiba, com uma taxa de 12,5% de positividade.

Assim como ocorre em isolados clínicos, a variedade *grubii* é recuperada com maior frequência em amostras ambientais no mundo inteiro (PASSONI *et al.*, 1998; MONTENEGRO e PAULA, 2000; FILIU *et al.*, 2002; HORTA *et al.*, 2002; CASALI *et al.*, 2003; NISHIKAWA *et al.*, 2003; CHEE e LEE, 2005; GRANADOS e CASTAÑEDA, 2005; KOBAYASHI *et al.*, 2005; LITVINTSEVA *et al.*, 2005; SOARES *et al.*, 2005; TAY *et al.*, 2005), sendo que esses isolados mostram distribuição regional similar aos isolados clínicos (FRANZOT *et al.*, 1997; NISHIKAWA *et al.*, 2003).

Segundo MONTENEGRO e PAULA (2000), existe alta contaminação por *C. neoformans* em centros urbanos, especialmente relacionada ao acúmulo de excretas de pombos em seus ninhos e adjacências, fazendo com que muitas pessoas estejam expostas aos propágulos infectantes do fungo.

A alta frequência de isolamento de *C. neoformans* em excretas de aves está ligada à presença de um ambiente favorável ao crescimento do fungo (STAIB, 1962b), pela sua adaptação bioquímica, que lhe confere a habilidade de assimilação de creatinina, ácido úrico e purinas como fonte de nitrogênio, compostos esses, em abundância nesse nicho ecológico. Apesar de também ser capaz de assimilar a creatinina, *C. gattii*, geralmente, não está associado às excretas de aves, devido, possivelmente, à regulação diferenciada de enzimas responsáveis por esse metabolismo (CASALI *et al.*, 2001).

As partículas infecciosas em excretas de pombos com tamanho compatível com a deposição alveolar, a recuperação de *C. neoformans* do ar de locais contaminados com excretas de aves, a virulência das linhagens isoladas e a alta prevalência de anticorpos em inquéritos sorológicos e testes intradérmicos em criadores de pombos sugerem que esta seja uma importante fonte de infecção (CASALI *et al.*, 2001).

Além dos Columbiformes, outras Ordens da Classe Aves, especialmente Passeriformes e Psittaciformes, podem contribuir para a propagação do fungo nas suas excretas (SWINNE-DESGAIN, 1975; STAIB e SCHULTZ-DIETERICH, 1984; BAUWENS *et al.*, 1986; FESSEL, 1993; CRISEO *et al.*, 1995; PAL, 1995; SORREL e ELLIS, 1997; CASADEVALL e PERFECT, 1998; PASSONI *et al.*, 1998; KIELSTEIN

et al., 2000; FILIÚ *et al.*, 2002; LAGROU *et al.*, 2005; TAY *et al.*, 2005; ABEGG *et al.*, 2006).

Desde a década de 60, muitos trabalhos têm demonstrado a presença de *C. neoformans* em excretas de Passeriformes e Psittaciformes (STAIB, 1962a) e a partir da década de 80, a levedura começou a ser extensivamente isolada a partir de gaiolas de *pet shops* e zoológicos (BAUWENS *et al.*, 1986). SWINNE-DESGAIN (1975) revelou 3 a 34,5% de positividade em excretas de canários. STAIB e SCHULZ-DIETERICH (1984) apontam a levedura em excretas de vários Psittaciformes em um zoológico na Alemanha. BAUWENS *et al.* (1986) encontraram alta frequência de positividade para *C. neoformans* em aviários contendo Psittaciformes, concluindo que eles poderiam ser uma fonte importante do fungo. Além de locais públicos, o próprio ambiente domiciliar pode conter o fungo em alta densidade (SWINNE *et al.*, 1989; STAIB, 1992; PASSONI *et al.*, 1998). CRISEO *et al.* (1995) obtiveram 26,6% de positividade em excretas de canários alojados em *pet shops* e domicílios.

No Brasil, isolamentos do basidiomiceto em excretas de Passeriformes e Psittaciformes já foram relatados por PASSONI *et al.* (1998), FILIÚ *et al.* (2002) e ABEGG *et al.* (2006).

PASSONI *et al.* (1998) observaram isolamento da levedura significativamente maior em excretas de aves mantidas em cativeiro em comparação à poeira domiciliar e peridomiciliar. De 79 amostras de excretas de aves, 12,7% foram positivas, sendo essas obtidas a partir de Psittaciformes (periquitos) e quatro espécies de Passeriformes: canário-belga, canário-terra-verdadeiro, coleirinho e galo-da-campina. Esses autores encontraram maior frequência de isolados positivos em residências que comportavam aves em cativeiro àquelas que não as possuíam, sendo esse apontado como o principal fator responsável pela contaminação domiciliar.

FILIÚ *et al.* (2002) obtiveram isolamento de *C. neoformans* a partir de excretas de aves de cativeiro e vida livre na cidade de Campo Grande/MS, com elevadas concentrações do fungo. O isolamento se fez a partir de 18 amostras de excretas envelhecidas e secas dos poleiros e grades de recintos contendo aves agrupadas, das seguintes espécies: canário-belga, canário-do-reino, canário-da-terra-verdadeiro, periquito-australiano, calopsita, agapornis, mandarim, pombo-rabo-

de-leque, pombo-africano e papagaio; além de duas amostras obtidas a partir de raspados de excretas encontradas em solo de ambiente aberto.

ABEGG *et al.* (2006) obtiveram amostras de excreta de aves provenientes do Parque Zoológico do Rio Grande do Sul, registrando 18,18% de amostras positivas, sendo todas elas pertencentes a Psittaciformes (papagaio-moleiro, papa-cacau, chauá, periquito-rei, jandaia, periquito-maracanã, periquito-australiano, calopsita, maitaca-de-maximiliano e periquito-alexandrino). Destas, 87% eram pertencentes a *C. neoformans* e 13% a *C. gattii*.

Os fatores macroclimáticos de cada região, como temperatura, umidade e exposição à luz, influenciam a obtenção de resultados positivos (FRANZOT *et al.*, 1997; CASADEVALL e PERFECT, 1998; MONTENEGRO e PAULA, 2000; GRANADOS e CASTAÑEDA, 2005; QUINTERO *et al.*, 2005). Similarmente às condições macroclimáticas, o microclima (temperatura e umidade do substrato), fatores abióticos e bióticos também influenciam o crescimento da levedura (GRANADOS e CASTAÑEDA, 2005).

Apesar do isolamento de *C. neoformans* ser abundante em excretas, o fungo dificilmente é isolado do aparelho digestório de aves (CASADEVALL e PERFECT, 1998; ROSARIO *et al.*, 2005; CAFARCHIA *et al.*, 2006a, 2006b). O mecanismo pelo qual as excretas tornam-se infectadas ainda é incerto (SORREL e ELLIS, 1997; FILIU *et al.*, 2002), entretanto se sugere que o desenvolvimento de *C. neoformas* em excretas de aves se deve à grande quantidade de células fúngicas no ambiente, as quais encontram compostos ricos em nitrogênio nas excretas, o que facilita a sua multiplicação (STAIB, 1962b; CASADEVALL e PERFECT, 1998; CHEE e LEE, 2005). Em estudo recente, ROSARIO *et al.* (2005) isolaram apenas 1,81% de *C. neoformans* a partir de amostras cloacais de pombos e CAFARCHIA *et al.* (2006b) obtiveram uma taxa de isolamento de 2,2% a partir de amostras cloacais de aves de rapina no Sul da Itália. Já CAFARCHIA *et al.* (2006a) não obtiveram resultado positivo para *C. neoformans* ou *C. gattii* a partir de swabs cloacais de 421 aves migratórias. Essa baixa ou nula taxa de isolamento se deve às más condições para o crescimento do fungo, possibilitada pela alta temperatura das aves e concentração de amônia nas fezes frescas, que alcaliniza o meio (SORREL e ELLIS, 1997).

SWINNE-DESGAIN (1975) sugeriu que *C. neoformans* fosse capaz de colonizar a mucosa do papo de pombos, sem causar doença, sendo considerado

endosaprobiótico natural dessas aves. Essa autora obteve quase 50% de isolamento da levedura a partir do inglúvio de pombos, mas nenhum isolado a partir do intestino delgado e grosso dessas aves. Segundo ela, o inglúvio das aves ficaria contaminado por longos períodos e quando existissem condições favoráveis à multiplicação do microrganismo, a levedura atingiria o tubo digestório distal, sendo eliminada pelas fezes. Com o ambiente superpopuloso, falta de limpeza, acúmulo de excretas e aumento de temperatura, por meio do ar, as excretas adjacentes tornar-se-iam infectadas. ROSARIO *et al.* (2005) sugerem que a maioria das leveduras contidas no papo das aves não sobrevive à passagem pelo aparelho digestório, com exceção às cepas termorresistentes, as quais podem se multiplicar na alta temperatura das aves, entretanto a administração experimental por via oral de *C. neoformans* para pombos e canários revelou que o fungo sobrevive à passagem no aparelho digestório (CASADEVALL e PERFECT, 1998). CAFARCHIA *et al.* (2006b) não obtiveram recuperação de *C. neoformans* ou *C. gattii* de nenhuma amostra dos segmentos do aparelho gastrointestinal de aves de rapina (águia-de-asa-redonda e lagarteiro-peneireiro) mortas, apesar de obterem 2,2% de *C. neoformans* var. *grubii* a partir de *swabs* cloacais, indicando que essas aves podem ser carreadoras de *C. neoformans* e demonstrando ausência da levedura no inglúvio.

Muitos trabalhos descrevem o desenvolvimento da criptococose em seres humanos após a exposição às excretas de aves (WEGENER e STAIB, 1983; FESSEL, 1993; CURRIE *et al.*, 1994; MICALIZZI *et al.*, 1997; NOSANCHUK *et al.*, 2000; SHRESTHA *et al.*, 2004; LAGROU *et al.*, 2005). NOSANCHUK *et al.* (2000) documentaram a ocorrência da criptococose em uma paciente que sofrera transplante renal e estabelecia contato com uma cacatua. SHRESTHA *et al.* (2004) relataram a possível transmissão zoonótica de criptococose pulmonar, a partir de uma calopsita, a um paciente recebendo terapia com infliximab (antagonista de fator de necrose tumoral alfa). LAGROU *et al.* (2005) relataram recentemente a transmissão de criptococose por ave de estimação e observaram que ambos os isolados clínicos e da excreta de um pega apresentavam similaridade bioquímica, cariotípica e genética. PASSONI *et al.* (1998) relatam maior incidência de criptococose em pacientes cujos domicílios continham maior frequência de isolamento de *C. neoformans* e as residências com maior contaminação, por sua vez, continham aves em cativeiro.

NOSANCHUK *et al.* (2000) e LAGROU *et al.* (2005) ilustram que não é necessário o contato próximo com aves de estimação para propiciar uma exposição ao agente e mesmo em contatos limitados pode-se evidenciar a aquisição da doença, até mesmo em pessoas imunocompetentes.

Além disso, a evidência da participação das aves como fonte de infecção em seres humanos já foi demonstrada pela identificação das mesmas linhagens em excretas de aves e isolados clínicos (CURRIE *et al.*, 1994; VARMA *et al.*, 1995; FRANZOT *et al.*, 1997; NOSANCHUK *et al.*, 2000; LAGROU *et al.*, 2005).

3.8 ASPECTOS CLÍNICOS EM SERES HUMANOS

A criptococose pode se apresentar de forma localizada ou generalizada (ROZENBAUM e GONÇALVES, 1994; PAPPALARDO e MELHEM, 2003), sendo na maioria das vezes, diagnosticada na forma disseminada (ROZENBAUM e GONÇALVES, 1994). Os propágulos colonizam primariamente os pulmões podendo causar doença aguda, subaguda ou crônica e, subseqüentemente, invadem o SNC, podendo acarretar quadros de meningite, encefalite ou meningoencefalite (CASADEVALL e PERFECT, 1998; CASALI *et al.*, 2001). Outros tecidos também são afetados, especialmente em indivíduos infectados pela aids ou em terapia imunossupressora drástica (MITCHELL e PERFECT, 1995). A maioria dos casos de infecção cutânea é decorrente da doença disseminada (CASADEVALL e PERFECT, 1998).

Apesar de o pulmão ser a porta de entrada do patógeno no organismo, a pneumonia raramente manifesta sinais clínicos, sendo a meningoencefalite a forma clínica mais comum da doença (CALVO *et al.*, 1991; ROZENBAUM e GONÇALVES, 1994; MITCHELL e PERFECT, 1995). As leveduras podem permanecer dormentes e serem reativadas por um evento imunocomprometedor (ABEGG, 2003). ROZENBAUM e GONÇALVES (1994) observaram que 91,8% dos pacientes apresentam criptococose disseminada e apenas 8,2% apresentam criptococose pulmonar. Aproximadamente 70 a 90% dos pacientes com aids e neurocriptococose possuem sinais e sintomas de meningite ou meningoencefalite subaguda, como cefaléia, náusea, vômito, febre, rigidez de nuca, letargia, alterações no estado mental, distúrbio na personalidade, perda de memória, lesões em nervos cranianos,

déficits visuais e outros, os quais ocorrem duas a quatro semanas antes do estabelecimento do diagnóstico. Grandes criptococomas pulmonares e cerebrais são comumente associados a *C. gattii* (CALVO *et al.*, 1991; ROZENBAUM e GONÇALVES, 1994; MITCHELL e PERFECT, 1995; DARZÉ *et al.*, 2000; FERNANDES *et al.*, 2000; CASALI *et al.*, 2003; PAPPALARDO e MELHEM, 2003).

A doença pode estar associada a outras infecções fúngicas, especialmente candidíase oral, dermatofitose, pitiríase versicolor, pneumocistose, paracoccidioidomicose ou histoplasmose e doenças oportunistas, incluindo a tuberculose e equinococose (MITCHELL e PERFECT, 1995; FERNANDES *et al.*, 2000; CASALI *et al.*, 2003; PAPPALARDO e MELHEM, 2003).

O neurotropismo da levedura, além de possibilitar a evasão ao sistema imune do hospedeiro, pode ser explicado pela grande quantidade de catecolamina existente no SNC, que serve de substrato para a enzima fenoloxidase, sendo que a melanina protege o agente da atividade oxidante do SNC (MITCHELL e PERFECT, 1995).

3.9 ASPECTOS LABORATORIAIS

O teste diagnóstico mais barato e prático é o exame direto do sedimento do líquido cefalorraquidiano (LCR) em suspensão com tinta da China, o qual possui sensibilidade de 96,3% em pacientes com aids (MITCHELL e PERFECT, 1995; CASALI *et al.*, 2001; PAPPALARDO e MELHEM, 2003). O teste de aglutinação de partículas em látex para detecção do antígeno polissacarídeo em fluidos orgânicos como LCR, soro e urina demonstra alta sensibilidade e especificidade, além de fornecer um rápido resultado. Sua principal desvantagem é o custo elevado (MITCHELL e PERFECT, 1995; PAPPALARDO e MELHEM, 2003). A sensibilidade é mais alta para o exame sorológico (aproximadamente 95%), seguida pela cultura (aproximadamente 75%) e exame direto microscópico (aproximadamente 50%) (MITCHELL e PERFECT, 1995). A contagem de leveduras não é diretamente proporcional aos títulos antigênicos, porém pode indicar a severidade da doença. Como nenhum método diagnóstico possui 100% de especificidade e sensibilidade, a combinação de exames se torna eficaz no diagnóstico da doença (MITCHELL e PERFECT, 1995; PAPPALARDO e MELHEM, 2003).

Após o começo do tratamento, a cultura tende a se mostrar negativa, enquanto os exames direto e sorológico permanecem positivos, servindo de monitoramento do tratamento (CALVO *et al.*, 1991).

A produção de anticorpos específicos ocorre somente em uma parte dos pacientes com criptococose e os títulos são geralmente baixos devido à estrutura antigênica do fungo que resulta em um imunógeno pobre tanto para o ser humano quanto para animais (ABEGG, 2003).

Nos tecidos, as leveduras encapsuladas aparecem envoltas por um halo claro, pois a cápsula é escassamente corada e as células aparecem colapsadas ou distorcidas. A resposta inflamatória é mínima ou possui aspecto granulomatoso. No histopatológico, a cápsula do fungo pode ser fortemente corada por mucicarmin de Mayer e azul de tripan (MITCHELL e PERFECT, 1995; PAPPALARDO e MELHEM, 2003).

3.10 CRIPTOCOCOSE EM ANIMAIS

A prevalência da criptococose parece ser igual ou até mesmo maior em animais de companhia quando comparada a de seres humanos (MALIK *et al.*, 1995, 1997). A espécie felina é a mais acometida (MALIK *et al.*, 1995, 1997; KERL, 2003) sendo que, em gatos, a criptococose é a micose sistêmica mais comum em países de clima temperado (KERL, 2003) e a segunda mais comum no Brasil, perdendo somente para esporotricose (LARSSON, 2000). Não existe predisposição sexual, sendo os animais de meia-idade e da raça Siamês mais acometidos (FLATLAND *et al.*, 1996). Não foram evidenciados fatores predisponentes para criptococose em animais, entretanto a leucemia viral felina e a imunodeficiência adquirida felina parecem ser desfavoráveis ao tratamento em gatos (KERL, 2003).

Em cães, a doença atinge adultos jovens, com idade média de dois anos, de ambos os sexos, de raças de grande porte, sem haver sazonalidade para o aparecimento dos sinais. Como ocorre no homem, *C. neoformans* é o responsável pela maioria das infecções e os animais infectados por *C. gattii* são pertencentes ao meio rural ou áreas suburbanas (FLATLAND *et al.*, 1996; KERL, 2003).

Segundo MALIK *et al.* (1995), a rinosinusite é a infecção primária na maioria dos cães e gatos, envolvendo a porção caudal da cavidade nasal e seios nasais,

atingindo o SNC através da placa cribiforme ou por via hematógena. Os sinais envolvem o aparelho respiratório superior (cavidade e plano nasal, ossos turbinados nasais, seios frontais, ossos e tecido subcutâneo, além do aparelho nasolacrimonasal e linfonodos), SNC e/ou bulbo ocular (MALIK *et al.*, 1995) e incluem deformidade nasal e facial, tumores protuberantes, corrimento nasal, espirro, estridores nasais e mudanças na fonação. A cegueira pode ser causada por descolamento de retina e coriorretinite granulomatosa. A meningoencefalite é caracterizada por depressão, paresia, papiledema, convulsão, ataxia, andar em círculo, cefaléia, dor toraco-lombar e cervical, distúrbios vestibulares e envolvimento múltiplo dos nervos cranianos. O aparelho respiratório inferior é raramente afetado e as lesões cutâneas aparecem em 50% dos gatos. Além disso, sinais inespecíficos podem incluir perda de peso, febre, letargia e anorexia, como resultado de doença crônica (MALIK *et al.*, 1995; FLATLAND *et al.*, 1996; KERL, 2003).

Em pequenos animais o diagnóstico é realizado da mesma forma que em seres humanos (FLATLAND *et al.*, 1996; KERL, 2003). O teste sorológico por meio de provas de aglutinação em látex também é utilizado e a resposta ao tratamento é correlacionada com o decréscimo dos títulos antigênicos (KERL, 2003), entretanto FLATLAND *et al.* (1996) encontraram títulos antigênicos persistentes por meses após a detecção da doença e instituição da terapia. Nos gatos, a sensibilidade do teste é de 90% a 95% e a especificidade chega a 100% (MEDLEAU *et al.*, 1990). Os testes sorológicos para a detecção de anticorpos não são utilizados devido a sua baixa sensibilidade e especificidade (MALIK *et al.*, 1999).

Os cavalos são mais acometidos por granulomas nasais, massas mixomatosas no pulmão e infecção labial (JUNGEMAN e SCHWARTZMAN, 1972). Na espécie bovina, a mastite criptocócica é a forma mais comum da doença e os sinais clínicos são extremamente variáveis, incluindo edema moderado e transitório em um ou mais quartos de teto até edema severo e distensão da glândula afetada. Os linfonodos supra-mamários também são afetados. As vacas com infecção moderada não demonstram outros sinais, já vacas com infecção severa mostram-se com grande desconforto e são relutantes aos movimentos, podendo haver febre, depressão, anorexia, desidratação, além de diminuição ou até ausência da produção láctea (JUNGEMAN e SCHWARTZMAN, 1972).

3.10.1 Criptococose em Aves

Embora estando presente em grande número no ambiente das aves, *Cryptococcus* spp. não causa doença nesses animais, na maioria das vezes, devido à alta temperatura corporal das aves, a qual inibe o crescimento da levedura (BAUWENS *et al.*, 1986; NIGRO *et al.*, 1987; MITCHELL e PERFECT, 1995) e da baixa capacidade de invasão sistêmica do fungo nessas espécies. A infecção subclínica, com subsequente erradicação da levedura no organismo pela imunidade celular intacta também pode ocorrer (CONNOLLY *et al.*, 1999). Neste caso, as aves poderiam funcionar como reservatório transitório e portadores assintomáticos da doença.

Os relatos da doença clínica em aves são restritos a Psittaciformes, Columbiformes, Anseriformes, cracídeos e frangos (GRINER e WALCH, 1978; CLIPSHAM e BRITT, 1983; ROSSKOPF e WOERPEL, 1984; FENWICH *et al.*, 1985; TAKESHITA *et al.*, 1986; GLAVITS *et al.*, 1988; HILL *et al.*, 1995; RAIDAL *et al.*, 2001; MALIK *et al.*, 2003; RASO *et al.*, 2004). A porta de entrada do agente pode ser por meio do trato respiratório ou da inoculação tegumentar. Em indivíduos imunocompetentes, a infecção é geralmente causada por *C. gattii*, sendo restrita ao aparelho respiratório superior e invasiva somente para estruturas próximas à cavidade nasal. Segundo ABEGG (2003), o fator de virulência mais importante de *C. gattii* é a termotolerância da cepa, o que explica a prevalência dessa espécie na criptococose aviária (MALIK *et al.*, 2003).

O diagnóstico *ante mortem* é difícil de ser realizado, pois os sinais são geralmente inespecíficos, incluindo fraqueza, depressão, dispnéia, anorexia, emaciação, diarreia, tumores orais, cegueira, incoordenação, paralisia progressiva, dificuldade em voar e eventualmente, morte súbita (RASO *et al.*, 2004).

Os princípios diagnósticos são os mesmos para humanos e outras espécies de mamíferos e o prognóstico geralmente é favorável se o animal apresenta doença localizada (MALIK *et al.*, 2003).

RASO *et al.* (2004) relataram uma epizootia de criptococose generalizada em Psittaciformes no estado de São Paulo, causada por *C. gattii*, sorotipo B. A lesão *post mortem* mais comum foi a presença de material mixomatoso no trato respiratório, cavidade celomática, seios nasais e cérebro. Os autores acreditam que os poleiros confeccionados com eucalipto tenham sido a fonte de infecção, já que

essas aves têm comportamento de bicar pedaços de madeira. Cabe-se ressaltar, entretanto, que o eucalipto não é uma fonte importante de *C. gattii* no Brasil.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ORIGEM DAS AMOSTRAS E LOCAIS DE COLETA

Foram utilizadas para este estudo amostras provenientes de excreta¹⁴ e conteúdo do lúmen do ingluvío e cloaca de Passeriformes e Psittaciformes procedentes do estado do Paraná. As aves eram recebidas no Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS) PUCPR/IBAMA ou procedentes de quatro aviários do município de Curitiba. O CETAS (FIGURA 2) é responsável pelo recebimento, triagem e encaminhamento de animais silvestres provenientes de apreensão por parte do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Renováveis (IBAMA), Instituto Ambiental do Paraná (IAP), Polícia Ambiental do Paraná e Delegacia do Meio Ambiente ou doação por particulares. Os animais recebidos são, em sua grande maioria, provenientes de residências de Curitiba e região metropolitana, além de outras regiões do estado do Paraná e, ocasionalmente, de outros estados.

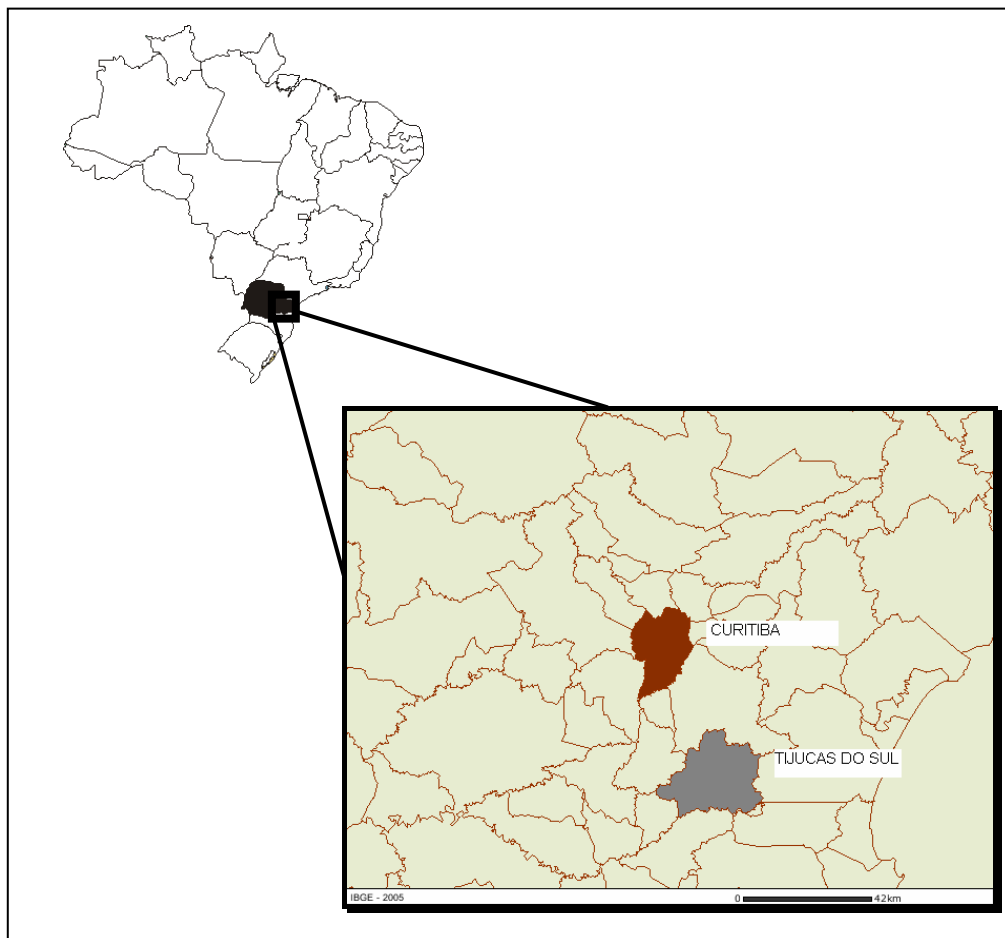
O CETAS PUCPR/IBAMA está situado no município de Tijucas do Sul/PR, localizado a 59 km da capital do estado, a 875 m de altitude (latitude 25°55'40" Sul, longitude 49°11'56") (IBGE, 2006). O município de Curitiba está localizado ao sul do Trópico de Capricórnio, na borda oriental do primeiro planalto paranaense (latitude 25°25'48" Sul e longitude 49°16'15" Oeste), em altitudes de 900 m. O clima é mesotérmico úmido com verão quente e temperatura média no verão de 21°C e 13°C no inverno e com pluviosidade de 1500mm/ano (MENDONÇA, 2001) (MAPA 1). O estado do Paraná possui uma área de 199.314.850 km², com 399 municípios (IBGE, 2006). Localiza-se na região sul-brasileira, entre as latitudes 22°29'30" e 26°42'59" e entre as longitudes a oeste de Greenwich de 48°02'24" e 54°37'38". O estado possui grande heterogeneidade entre as zonas de paisagens naturais que comporta, dentre elas: a planície litorânea, o primeiro planalto ou planalto de Curitiba, o segundo planalto ou planalto de Ponta Grossa e o terceiro planalto ou planalto de Guarapuava. Assim como a topografia, o clima também possui um aspecto heterogêneo dependente da paisagem natural onde está inserido (MAACK, 2002).

¹⁴ Mistura de fezes, urina e urato

FIGURA 2 – FOTOGRAFIA DA FACHADA FRONTAL DO CETAS PUCPR/IBAMA, DE ONDE FORAM OBTIDAS AMOSTRAS DE PASSERIFORMES E PSITTACIFORMES



MAPA 1 – LOCALIZAÇÃO DOS MUNICÍPIOS DE CURITIBA E TIJUCAS DO SUL/PR EM RELAÇÃO AO MAPA DO BRASIL



FONTE: INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Cidades.** Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>> Acesso em 18 jul. 2006. Modificado por Camile Lugarini.

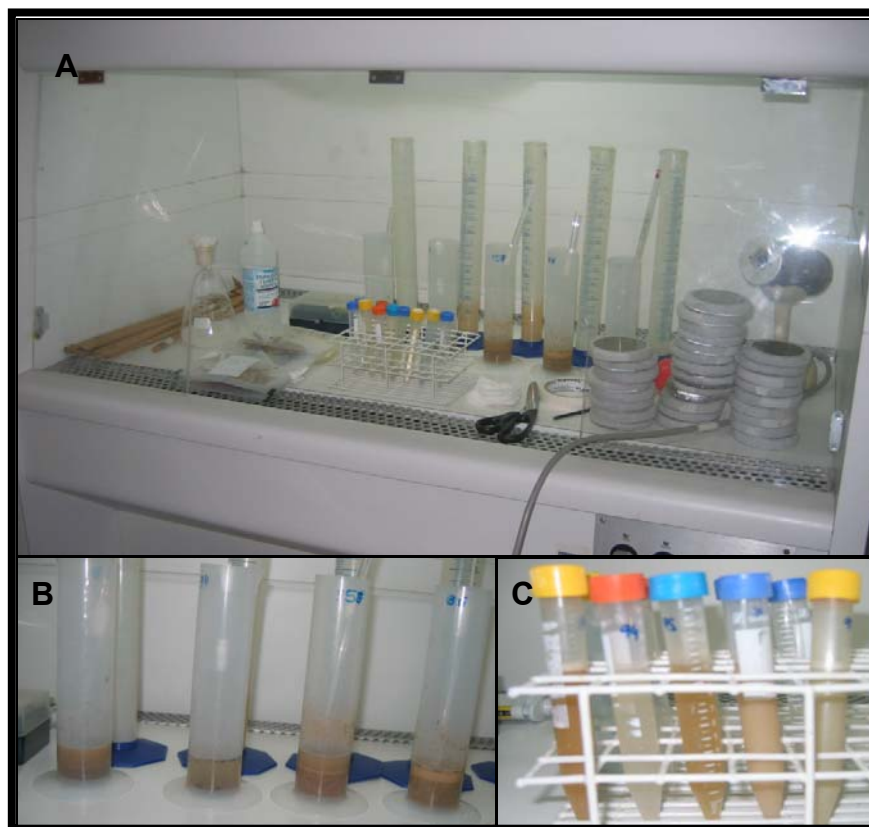
4.2 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS E ISOLAMENTO DA LEVEDURA

Foram coletadas amostras de excretas a partir de poleiros, fundo e grades das gaiolas do CETAS e aviários de Curitiba e armazenadas em frascos plásticos, sendo devidamente identificadas e enviadas para o Laboratório de Micologia do Setor de Microbiologia do Serviço de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná. Essas amostras ambientais foram processadas em câmara de fluxo laminar, conforme o método de STAIB modificado (NIGRO *et al.*, 1987; MACHADO *et al.*, 1993). Aproximadamente 10 g das amostras coletadas foram suspensas em 40 ml de solução fisiológica estéril em provetas de plástico de 250 ml. Após agitação (2 min) em vórtex, a suspensão ficou em repouso por 10 min. Do sobrenadante, 8 ml foram aspirados por pipetas de Pasteur e colocados em um tubo cônico com tampa contendo 2 ml de solução com penicilina cristalina 1.200.000 UI (4,5 mg/ml) e estreptomicina (10 mg/ml). Dessa mistura, 100 µl foram repicados em três placas de Petri contendo ágar Níger, incubadas a 30°C e observadas diariamente por sete dias (NIGRO *et al.*, 1987; MACHADO *et al.*, 1993), entretanto as amostras positivas eram detectadas, na sua maioria, em 48 a 72 h (MALIK *et al.*, 1997; CONNOLLY *et al.*, 1999) (FIGURA 3).

O meio de cultura ágar Níger (*Guizotia abyssinica*) foi descrito por STAIB (1962b, 1963), modificado por SHIELDS e AJELLO (1966). Neste meio, as colônias de *C. neoformans* e *C. gattii* adquirem uma coloração marrom, devido a atividade fenoloxidase em presença de substrato contendo compostos fenólicos.

As colônias sugestivas de *C. neoformans* e *C. gattii*, com coloração marrom-enegrecidas, foram repicadas em ágar Níger para isolamento e em ágar Sabouraud para a realização da caracterização da amostra. Os repiques para obtenção de isolados puros foram realizados tantos quanto necessários. Cada isolado foi representado por uma colônia obtida a partir do ágar Níger (FRANZOT *et al.*, 1997).

FIGURA 3 – FOTOGRAFIAS ILUSTRANDO O PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE EXCRETA DE PASSERIFORMES E PSITTACIFORMES EM FLUXO LAMINAR. A) MATERIAIS NECESSÁRIOS PARA O PROCESSAMENTO. B) SUSPENSÃO DAS AMOSTRAS DE EXCRETA EM 40 ml DE SOLUÇÃO FISIOLÓGICA ESTÉRIL EM PROVETAS DE PLÁSTICO DE 250 ml. C) SOBRENADANTE EM TUBO CÔNICO COM TAMPA CONTENDO 2 ml DE SOLUÇÃO COM PENICILINA CRISTALINA 1.200.000 UI (4,5 mg/ml) E ESTREPTOMICINA (10 mg/ml)

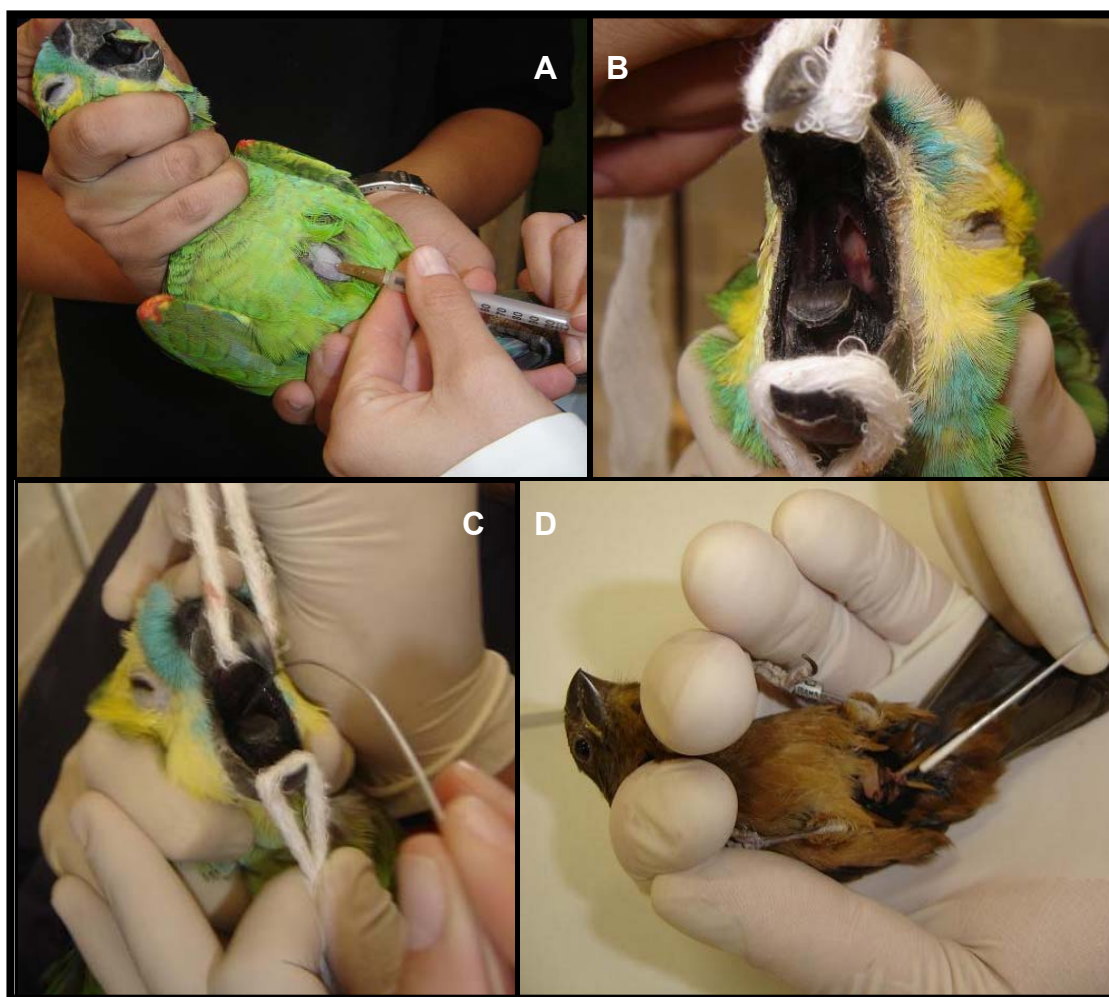


Adicionalmente, foram obtidas amostras de conteúdo de ingluvío e cloacal, por meio de *swabs* uretrais (Bionete, Biolog¹⁵), de Passeriformes e Psittaciformes escolhidos aleatoriamente no CETAS PUCPR/IBAMA (FIGURA 4). Para tanto, as aves foram capturadas e contidas manualmente com o auxílio de luvas e toalhas. Para a sua obtenção de amostras, os Psittaciformes foram contidos fisicamente e tranqüilizados com midazolam (3 mg/kg IM) 15 minutos antes do procedimento e os Passeriformes foram contidos manualmente, sem tranqüilização prévia (FIGURA 4). Utilizou-se duas gazes para a realização da abertura do bico e posterior penetração do *swab* uretral da cavidade oral ao ingluvío. As amostras de cloaca e ingluvío foram semeadas, logo após a sua obtenção, em um tubo ou placa contendo ágar Níger e enviadas para o Laboratório de Micologia do Setor de Microbiologia do Serviço de

¹⁵ São Paulo, SP, Brasil

Análises Clínicas do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, sendo mantidas a 30°C por sete dias e observadas diariamente. As colônias suspeitas foram repicadas em ágar Níger e Sabouraud como descrito anteriormente.

FIGURA 4 – SEQÜÊNCIA DE FOTOGRAFIAS DEMONSTRANDO A COLETA DE AMOSTRAS A PARTIR DE SWABS. A) CONTENÇÃO FÍSICA E APLICAÇÃO INTRAMUSCULAR DE MIDAZOLAM PARA A TRANQÜLIZAÇÃO. B) ABERTURA DO BICO COM DUAS GAZES. C) COLETA DE AMOSTRA COM SWAB URETRAL A PARTIR DO INGLÚVIO. D) COLETA DE AMOSTRA COM SWAB URETRAL A PARTIR DA CLOACA



4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS

Os isolados foram caracterizados por métodos morfológicos, bioquímicos, sorológicos e moleculares.

4.3.1 Caracterização Morfológica e Bioquímica

4.3.1.1 Micromorfologia

A análise morfológica microscópica das colônias suspeitas foi realizada por meio de montagens em lâmina com o uso dos corantes lactofenol azul de algodão ou tinta da China. A suspensão de cada isolado foi observada ao microscópio óptico com aumento de 100 e 400 vezes. A identificação de *Cryptococcus* spp. foi realizada pela observação de leveduras de tamanho regular, globosas, arredondadas, encapsuladas, com ou sem brotamento, sem hifas ou pseudo-hifas (CASADEVALL e PERFECT, 1998).

4.3.1.2 Atividade fenoloxidase

A síntese de pigmentos de melanina a partir do fenol é específica de *C. neoformans* e *C. gattii* (SIDRIM e MOREIRA, 1999). Meios contendo sementes de níger servem de substrato para a enzima fenoloxidase, que catalisa a oxidação de compostos O-difenólicos como L-dopa, L-dopamina, ácido clorogênico e ácido caféico, produzindo uma colônia marrom-escura ou negra em até cinco dias. Ocasionalmente, *C. luteolus*, *C. laurentii*, *C. terreus* e *C. albidus* podem desenvolver pigmentação mais clara em períodos de incubação prolongados (KWON-CHUNG e BENNETT, 1992; IKEDA *et al.*, 2002).

Todos os isolados de *C. neoformans* foram analisados quanto à capacidade de produção de melanina em ágar Níger à 30°C. O desenvolvimento de colônias de coloração marrom foi considerado como resultado positivo.

4.3.1.3 Hidrólise da uréia

A detecção da enzima urease, a qual identifica o gênero *Cryptococcus*, foi analisada pela utilização do meio uréia-ágar-base (CHRISTENSEN, 1946). Nesta reação, observa-se a hidrólise da uréia com produção de amônia e alcalinização do meio, causando alteração do indicador de pH de neutro para básico, evidenciando-se, assim, uma coloração de tom róseo intenso. Os isolados foram repicados nesse meio e incubados a 30°C por cinco dias (KNOW-CHUNG e BENNETT, 1982).

4.3.1.4 Termotolerância à 37°C

Dentre o gênero *Cryptococcus*, apenas *C. neoformans* e *C. gattii* são capazes de crescer a 37°C (SIDRIM e MOREIRA, 1999). Para análise da termotolerância, as amostras foram repicadas em ágar Sabouraud, mantidas a 37°C por sete dias e observadas diariamente.

4.3.1.5 Sensibilidade à cicloheximida

O desenvolvimento de *Cryptococcus* spp. é inibido na presença de cicloheximida. Os isolados foram inoculados em ágar Sabouraud suplementado com cloranfenicol e cicloheximida e incubados a 30°C por sete dias (SIDRIM e MOREIRA, 1999).

4.3.1.6 Assimilação de carboidratos e nitrogênio

A técnica de assimilação de carboidratos baseia-se na capacidade das leveduras em utilizar determinado carboidrato como única fonte de carbono para a sua viabilidade celular (SIDRIM e MOREIRA, 1999). A técnica auxanográfica foi escolhida por apresentar resultados de fácil leitura com menor ambigüidade (KNOW-CHUNG e BENNETT, 1992).

Para a realização do auxanograma, utilizou-se a técnica de Wickerham, com o meio carbono (LACAZ, 1991) como meio basal, o qual é destituído de qualquer fonte de carbono. Após a confecção preliminar do meio, o mesmo foi distribuído em alíquotas de 20 ml, em tubo de ensaio de vidro, e mantido sob refrigeração. No momento do uso, fundiu-se o meio em banho-maria e resfriou-se a uma temperatura de 45 a 50°C. Preparou-se, simultaneamente, 6 ml de uma suspensão de levedura purificada e jovem (24 a 48 horas de crescimento a 30°C), com turvação equivalente ao tubo número cinco da escala de McFarland. Em três placas de Petri de 150 x 20 mm, alíquotas de 2 ml dessa suspensão foram adicionadas a 40 ml de meio basal fundido e resfriado, seguido de movimentos rotacionais para homogeneização. Após a solidificação do meio foram distribuídos discos ou açúcar *in natura* de maltose, dextrose, sacarose, lactose, D-galactose, melibiose, celobiose, inositol, trealose, D-xilose, rafinose e dulcitol. As placas foram incubadas a 30°C e lidas em 24 e 48 h. A positividade foi observada quando se denotou a formação de um halo de

crescimento macroscópico em torno do disco ou do açúcar (SIDRIM e MOREIRA, 1999).

A técnica de assimilação de nitrogênio demonstra a capacidade da levedura em assimilar nitrato de potássio como única fonte de nitrogênio. A metodologia utilizada foi semelhante à mencionada anteriormente para assimilação de carboidratos, porém, neste caso, utilizou-se 40 ml de meio nitrogênio (LACAZ, 1991) como meio basal adicionado a 2 ml de uma suspensão de leveduras correspondente ao tubo número cinco da escala de McFarland. A peptona foi empregada como controle da viabilidade do inóculo, visto que todas as leveduras a utilizam como fonte nitrogenada (SIDRIM e MOREIRA, 1999).

4.3.1.7 Quimiotipagem

Para diferenciar as espécies de *C. neoformans* e *C. gattii* foi utilizado o meio canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB) (KNOW-CHUNG *et al.*, 1982). As colônias de *C. gattii* utilizam a glicina como fonte de carbono e nitrogênio e são resistentes à canavanina, mostrando uma coloração azul-cobalto, enquanto que *C. neoformans* não demonstra mudança na coloração do meio. Os isolados foram repicados em meio CGB e incubados a 30°C por até cinco dias, observando-se diariamente a coloração do meio (KNOW-CHUNG e BENNETT, 1992). Foram utilizadas duas amostras de referência WM 148 (sorotipo A) e WM 161 (sorotipo B), cedidas pelo Laboratório de Biologia de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica, Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, Universidade Federal do Rio Grande do Sul¹⁶, como controle negativo e positivo, respectivamente (MEYER *et al.*, 2003).

4.3.2 Aglutinação de partículas em látex

A aglutinação de partículas em látex foi realizada no Laboratório de Sorologia do Serviço de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná¹⁷, com o *kit Latex-Cryptococcus Antigen Detection System* (Immuno-Mycologics, Inc.¹⁸). Esse teste é direcionado para a detecção qualitativa e semi-

¹⁶ Porto Alegre, RS, Brasil

¹⁷ Curitiba, PR, Brasil

¹⁸ Norman, OK, USA

quantitativa de antígenos capsulares de *C. neoformans* e *C. gattii* no LCR e soro. O teste baseia-se na aglutinação de partículas em látex, ligado a anti-anticorpos, detectando um mínimo de aproximadamente 3,2 ng/ml de antígenos capsulares (ABEGG, 2003).

Uma alçada (10 µl) de uma cultura jovem de *C. neoformans*, em ágar Sabouraud incubado a 30°C por 48 h, foi transferida para um microtubo contendo 900 µl de solução salina 0,85%. Foram adicionados à placa de detecção do *kit* 10 µl da suspensão do microrganismo e 10 µl do látex (ABEGG, 2003), agitando-se a 100 rpm por 5 min. Os controles positivo e negativo fornecidos pelo *kit* foram utilizados juntamente com as amostras.

4.3.3 Caracterização Molecular

A caracterização molecular foi realizada por meio da PCR *multiplex*, PCR *fingerprinting* e PCR para identificação do tipo molecular. Os subcultivos de todos os isolados foram enviados para o Laboratório de Biologia de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica, Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, onde foram realizadas todas as análises moleculares.

4.3.3.1 Extração do DNA

Para extração do DNA, foi utilizado o método com pérolas de vidro modificado, descrito por POETA *et al.* (1999). Para isto, os isolados de *Cryptococcus* spp. foram semeados em ágar Sabouraud a 30°C por 48 h. As colônias foram transferidas para um microtubo de 2 ml graduado, contendo 250 µl de pérolas de vidro (0,45 mm), 500 µl de TENTs (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 200 mM, EDTA 1 mM pH 8,0, Triton X-100 2%, SDS 1%) e 500 µl de fenol-clorofórmio. Os tubos foram agitados em vórtex por 3 min e centrifugados a 13.000 rpm por 15 min. A fase aquosa foi transferida para outro tubo, adicionando-se 1 volume de etanol absoluto gelado e mantendo-se a -20° C por 12 h. O DNA foi coletado por centrifugação a 13.000 rpm por 15 min, descartando-se o sobrenadante e adicionando-se ao sedimento 500 µl de TE (Tris 10 mM pH 8,2, EDTA 1 mM pH 8,0) contendo RNase A na concentração de 50 µg/ml e incubando-se a 37°C por 30 min. O DNA foi re-

extraído com 500 µl de fenol-clorofórmio, centrifugado a 13.000 rpm por 15 min e o sobrenadante transferido para outro tubo, adicionando-se 50 µl de NaCl 5 M, mantido a -20°C por 12 h. O DNA foi novamente coletado por centrifugação a 13.000 rpm, por 15 min e o sobrenadante descartado. O sedimento foi lavado com etanol 70% gelado e ressuspenso com 30 µl de TE e armazenado à -20°C. A integridade do DNA extraído foi verificada por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio, a 100 V por 40 min.

4.3.3.2 PCR *multiplex*

Para determinar a espécie dos isolados foram utilizados os pares de oligonucleotídeos iniciadores CNA 70A (5'- ATTGCGTCCATGTTACGTGGC-3') e CNA 70S (5'-ATTGCGTCCACCAAGGAGCTC-3'), específicos para *C. neoformans*, e, CNB 49A (5'-ATTGCGTCCATCCAACCGTTATC-3') e CNB 49S (5'-ATTGCGTCCAAGTG TTGTTG-3'), específicos para *C.gattii*, que originam produtos de 695 pb e 448 pb, respectivamente (AOKI *et al.*, 1999; HORTA *et al.*, 2002; CASALI *et al.*, 2003). A PCR foi conduzida em um volume final de 25 µl. Cada reação conteve 20 ng de DNA, solução tampão para PCR 1X (Tris-HCl 10 mM pH 8,3, KCl 50 mM, MgCl₂ 2,5 mM), 200 µM de cada dNTP, 3 mM de cloreto de magnésio, 1U de Taq DNA polimerase (CenBiot Enzimas¹⁹) e 25 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador. A PCR foi realizada em 25 ciclos em um termociclador (MiniCycleTM, MJ Research, Inc.²⁰), com desnaturação inicial por 10 min à 94°C, 1 min para desnaturação à 94°C, 1 min de anelamento à 65°C e 2 min de extensão à 72°C, seguidos por um ciclo de extensão final por 10 min à 72°C. Os produtos de amplificação, corados com brometo de etídio (0,5 µg/ml), foram corridos em eletroforese em gel agarose 1,5% à 100 V por 90 min (HORTA *et al.*, 2002; CASALI *et al.*, 2003). Foram utilizados como controles positivos amostras de referência WM 148 (VNI - sorotipo A) e WM 161 (VGIII - sorotipo B) (MEYER *et al.*, 2003).

4.3.3.3 PCR *fingerprinting*

Para a PCR *fingerprinting* foi utilizada a sequência específica minissatélite do oligonucleotídeo M13 (5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3') (MEYER *et al.*, 1999, 2003) e

¹⁹ Porto Alegre, RS, Brasil

²⁰ Waltham, Massachusetts, USA

uma sequência repetitiva simples (microsatélite) (GACA)₄ (MEYER *et al.*, 1999; IGREJA *et al.*, 2004; ABEGG *et al.*, 2006). As reações de amplificação foram realizadas em um volume de 50 µl contendo 25 ng de DNA genômico de alto peso molecular, solução tampão para PCR 1X (Tris-HCl 10 mM pH 8,3, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM), 0,2 mM de cada dNTP, 3 mM de acetato de magnésio, 30ng de oligonucleotídeo iniciador e 2,5 U de Taq DNA polimerase (CenBiot Enzimas). A PCR foi realizada em 40 ciclos em um termociclador (MiniCycle™, MJ Research, Inc.), com 20 s de desnaturação à 94°C, 1 min de anelamento à 50°C e 20 s de extensão à 72°C, seguidos por um ciclo de extensão final por 6 min à 72°C e 30 s a 4°C. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel-agarose 1,4%, por 6 h à 60 V, corados com brometo de etídio (0,5 µg/ml) e visualizados sob luz ultravioleta. Foram utilizados como controles positivos amostras de referência WM 148 (VNI - sorotipo A), WM626 (VNII – sorotipo A), WM628 (VNIII – sorotipo AD), WM629 (VNIV – sorotipo D), WM179 (VGI – sorotipo B), WM178 (VGII – sorotipo B), WM161 (VGIII – sorotipo B) e WM779 (VGIV – sorotipo C) (MEYER *et al.*, 1999, 2003).

4.3.3.4 Determinação do tipo reprodutivo

Para a determinação do MAT α foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores $\alpha 1$ (5'- CTTCACTGCCATCTTCACCA – 3') e $\alpha 2$ (5'-GACACAAAGGGTCATGCCA – 3') e para a determinação do MAT α , a1 (5'-CGCCTTCACTGCTACCTTCT – 3') e a2 (5'- AACGCAAGACTAAGTCGGGC – 3'), que amplificam seqüências de 101 e 117 pares de bases, respectivamente (CHATURVEDI *et al.*, 2000). As reações foram realizadas em um volume final de 25 µl contendo 20 ng de DNA, tampão para PCR 1X (Tris-HCl 10 mM pH 8,3, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM), 20 mM de dNTPs, 25 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador e 1,8 U de Taq DNA polimerase (CenBiot Enzimas), sendo realizados 30 ciclos em um termociclador (MiniCycle™, MJ Research, Inc.), com aquecimento inicial a 94°C por 10 min, seguido por 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 60°C por 1 min, extensão a 72°C por 1 min e extensão final a 72°C por 10 min. Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel agarose 2%, corado com brometo de etídio (0,5 µg/ml) e visualizados sob luz ultravioleta.

4.4 AMOSTRAS CLÍNICAS

Foram utilizadas 25 amostras clínicas isoladas a partir de seres humanos, provenientes da Micoteca do Laboratório de Micologia do Setor de Microbiologia do Serviço de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, para a comparação molecular com as amostras ambientais. As amostras clínicas incluídas foram as mais recentes (21/05/04 a 13/12/05), para que os repiques sucessivos não interferissem nas características moleculares dos isolados, sendo todas obtidas antes de iniciar a terapia antifúngica. Isolados procedentes de pacientes com reincidência da doença foram excluídos. Essas amostras foram previamente identificadas na rotina laboratorial, a partir da micro e macromorfologia, testes bioquímicos convencionais ou através de técnica automatizada (Vitek-BioMérieux²¹), além do uso do meio CGB para a identificação da espécie. Estas amostras foram submetidas a PCR *multiplex*, *fingerprinting* e para identificação do tipo reprodutivo juntamente com as amostras ambientais.

4.5 PRESERVAÇÃO DOS ISOLADOS

Para a manutenção dos isolados em longo prazo, utilizou-se a criopreservação. Após a obtenção de colônias puras jovens em ágar Sabouraud (24 a 48 h à 30°C), o inóculo foi suspenso em 1 a 2 ml de glicerol 15% e/ou meio constituído por leite em pó desnatado 20% e estocado à -70°C (KNOW-CHUNG e BENNETT, 1992).

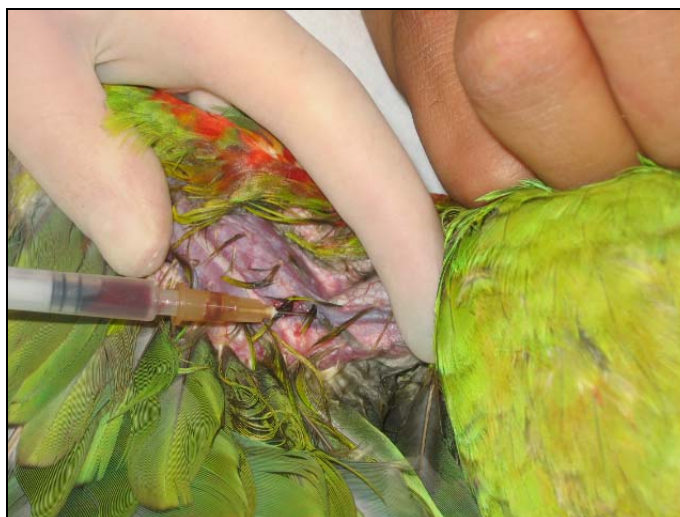
4.6 ANTIGENEMIA EM PSITTACIFORMES

Foram realizadas colheitas de sangue de Psittaciformes, provenientes do CETAS PUCPR/IBAMA, com mais de 300 g para obtenção de um volume final de 1 a 2 ml. Para isso, os animais foram capturados e contidos por meios físicos. Utilizou-se a veia radial ou ulnar, localizada na face medial da asa, juntamente com seringas de 1 e 3 ml e agulhas 13 x 4,5 mm, sem anticoagulante (FIGURA 5). O sangue foi

²¹ Marcy l'Etoile, France

armazenado em tubos de vidro, identificados e conservados em isopor com gelo até o seu encaminhamento para o Laboratório de Análises Clínicas da Unidade Hospitalar de Animais de Companhia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná²². Neste local, o sangue foi centrifugado a 2000 rpm por 15 min, o soro foi separado, através de micropipetas, e armazenado em tubos de vidro, sendo mantidos a -20°C até a realização da antigenemia. Não foram colhidas amostras de sangue de Passeriformes, devido ao seu tamanho, o que impossibilita a obtenção do volume de soro necessário para a realização do teste de aglutinação.

FIGURA 5 – FOTOGRAFIA REPRESENTATIVA DEMONSTRANDO A COLHEITA DE SANGUE ATRAVÉS DA VEIA ULNAR OU RADIAL EM PSITTACIFORMES



A antigenemia foi realizada no Laboratório de Sorologia do Serviço de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná com o *kit Latex-Cryptococcus Antigen Detection System* (Immuno-Mycologics, Inc.), seguindo as orientações do fabricante.

O pré-tratamento da amostra foi realizado anteriormente ao teste, para evitar resultados falso-positivos, induzidos por fatores reumatóides, que são inibidos pela pronase. A pronase foi reconstituída em água destilada e aliquoteada em volumes de 25 µl em microtubos e adicionada a 150 µl de cada amostra. A mistura foi incubada em banho-maria à 56°C por 30 min. Após esse período, uma gota de inibidor de pronase foi adicionada e misturada para o término da digestão enzimática.

²² São José dos Pinhais, PR, Brasil

Para a realização da antígenemia, 25 µl de controle positivo e negativo, além de cada amostra pré-tratada com pronase foi adicionada a 25 µl de látex na placa de detecção, misturando-se com ponteiros e misturador à 100 rpm por 5 min. A leitura foi realizada imediatamente após a retirada da placa do misturador.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a comparação das frequências de resultados positivos entre a Ordem estudada (Passeriforme ou Psittaciforme), local de coleta (CETAS x Aviários de Curitiba), gaiolas individuais ou coletivas e gaiolas com uma ou mais espécies, procedência das aves e origem do isolado (cloaca, inglúvio ou excreta) foi utilizado o teste para variáveis não-paramétricas denominado Qui-quadrado. Esse mesmo teste foi utilizado para a comparação de frequências em amostras clínicas. Valores de $P \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5 RESULTADOS

5.1 ISOLAMENTO DE *C. neoformans* A PARTIR DE EXCRETAS, CLOACA E INGLÚVIO DE PASSERIFORMES E PSITTACIFORMES

Foram obtidas 141 amostras de excretas úmidas e ressecadas de Passeriformes e Psittaciformes alojados em gaiolas individuais ou coletivas, escolhidos aleatoriamente, sendo 122 amostras provenientes de aves do CETAS PUCPR/IBAMA e 19 de aviários de Curitiba. As coletas no CETAS foram realizadas no período compreendido entre 15 de outubro de 2004 a 22 de novembro de 2005 e as coletas nos aviários de Curitiba de 30 de agosto a 14 de setembro de 2005.

Das 122 amostras de excreta, de 40 espécies diversas, provenientes de gaiolas individuais ou coletivas do CETAS PUCPR/IBAMA, 81,15% (99/122) pertenciam a Passeriformes e 18,85% (23/122) a Psittaciformes, conforme TABELAS 1, 2 e 3. Dessas amostras, somente uma (1/23 – 4,35% ou 1/122 – 0,82%), de Psittaciforme foi positiva e 34/99 (34,34%) (ou 34/122 – 27,87%) de Passeriformes, totalizando 28,69% (35/122) de positividade (TABELA 4; GRÁFICO 1). O número de amostras positivas foi significativamente maior para Passeriformes a Psittaciformes ($P \leq 0,025$). Apesar disso, cabe ressaltar que o número de amostras coletadas das Ordens estudadas não foi uniforme.

Das 19 amostras de excretas coletadas a partir de aviários de Curitiba, de seis espécies distintas, nove (47,37%) eram pertencentes a Passeriformes, nove (47,37%) a Psittaciformes e uma (5,26%) era pertencente a uma gaiola com um Passeriforme e um Psittaciforme alojados conjuntamente (TABELAS 1, 2 e 3). Dessas amostras, somente uma (1/19 – 5,26%), pertencente a um periquito-australiano, foi considerada positiva (TABELA 4; GRÁFICO 1). Quando consideradas somente as amostras provenientes de aviários, não houve diferença significativa entre isolados de Passeriformes e Psittaciformes ($P \leq 1$).

TABELA 1 – AMOSTRAS DE EXCRETA PROVENIENTES DE GAIOLAS CONTENDO SOMENTE UMA ESPÉCIE DE PASSERIFORME, DO CETAS PUCPR/IBAMA E DE AVIÁRIOS DE CURITIBA, EVIDENCIANDO O NÚMERO DE AMOSTRAS COLETADAS DE CADA ESPÉCIE.

NOME CIENTÍFICO	NOME COMUM	LOCAL DE COLETA	NÚMERO DE AMOSTRAS
<i>Carduelis magellanicus</i>	Pintassilgo	CETAS PUCPR/IBAMA	04
<i>Cacicus chrysopterus</i>	Soldado	CETAS PUCPR/IBAMA	01
<i>Euphonia chalybea</i>	Cais-cais	CETAS PUCPR/IBAMA	01
<i>Gnorimopsar chopi</i>	Melro	CETAS PUCPR/IBAMA	02
<i>Lonchura striata domestica</i>	Manon	Aviários de Curitiba	01
<i>Mimus saturninus</i>	Sabiá-do-campo	CETAS PUCPR/IBAMA	01
<i>Moluthrus banariensis</i>	Chopim	CETAS PUCPR/IBAMA	02
<i>Oryzoborus angolensis</i>	Curió	CETAS PUCPR/IBAMA	03
<i>Padda oryzivora</i>	Calafate	Aviários de Curitiba	01
<i>Paroaria coronata</i>	Cardeal	CETAS PUCPR/IBAMA	02
<i>Passerina brissonii</i>	Azulão	CETAS PUCPR/IBAMA	03
<i>Platicyclha flavipes</i>	Sabiá-una	CETAS PUCPR/IBAMA	07
<i>Saltator similis</i>	Trinca-ferro	CETAS PUCPR/IBAMA	12
<i>Serinus canarius</i>	Canário-belga	Aviários de Curitiba	07
<i>Sicalis flaveola</i>	Canário-da-terra-verdadeiro	CETAS PUCPR/IBAMA	12
<i>Sporophila caerulea</i>	Coleirinho	CETAS PUCPR/IBAMA	11
<i>Sporophila frontalis</i>	Pichochó	CETAS PUCPR/IBAMA	06
<i>Sporophila sp.</i> ⁽¹⁾		CETAS PUCPR/IBAMA	01
<i>Turdus albicollis</i>	Sabiá-coleira	CETAS PUCPR/IBAMA	04
<i>Turdus amaurochalinus</i>	Sabiá-poca	CETAS PUCPR/IBAMA	01
<i>Turdus leucomelas</i>	Sabiá-barranco	CETAS PUCPR/IBAMA	01
<i>Turdus nigriceps</i>	Sabiá-ferreiro	CETAS PUCPR/IBAMA	01
<i>Turdus rufiventris</i>	Sabiá-laranjeira	CETAS PUCPR/IBAMA	06
<i>Zonotrichia capensis</i>	Tico-tico	CETAS PUCPR/IBAMA	04
Híbrido entre <i>S. canarius</i> e <i>C. magellanicus</i>	Pintagol	CETAS PUCPR/IBAMA	01
TOTAL			95

(1) Indivíduo identificado ao nível de gênero, sem definição de espécie.

TABELA 2 – AMOSTRAS DE EXCRETA PROVENIENTES DE GAIOLAS CONTENDO SOMENTE UMA ESPÉCIE DE PSITTACIFORME, DO CETAS PUCPR/IBAMA E AVIÁRIOS DE CURITIBA, EVIDENCIANDO O NÚMERO DE AMOSTRAS COLETADAS DE CADA ESPÉCIE.

NOME CIENTÍFICO	NOME COMUM	LOCAL DE COLETA	NÚMERO DE AMOSTRAS
<i>Agapornis sp.</i>	Agapornis	Aviários de Curitiba	03
<i>Amazona aestiva</i>	Papagaio-verdadeiro	CETAS PUCPR/IBAMA	06
<i>Amazona amazonica</i>	Papagaio-do-mangue	CETAS PUCPR/IBAMA	01
<i>Amazona brasiliensis</i>	Papagaio-de-cara-roxa	CETAS PUCPR/IBAMA	02
<i>Amazona vinacea</i>	Papagaio-de-peito-roxo	CETAS PUCPR/IBAMA	06
<i>Ara ararauna</i>	Arara-canindé	CETAS PUCPR/IBAMA	01
<i>Brotogetis tirica</i>	Periquito-rico	CETAS PUCPR/IBAMA	03
<i>Melopsittacus undulatus</i>	Periquito-australiano	Aviários de Curitiba	04
<i>Myiopsitta monachus</i>	Caturrita	CETAS PUCPR/IBAMA	01
<i>Nymphicus hollandicus</i>	Calopsita	Aviários de Curitiba	02
<i>Pionopsitta pileata</i>	Cuiú-cuiú	CETAS PUCPR/IBAMA	01
<i>Pionus maximiliani</i>	Maitaca-de-maximiliano	CETAS PUCPR/IBAMA	02
TOTAL			32

TABELA 3 – AMOSTRAS DE EXCRETA PROVENIENTES DE GAIOLAS COLETIVAS DE PASSERIFORMES E PSITTACIFORMES COLETADAS NO CETAS PUCPR/IBAMA E AVIÁRIOS DE CURITIBA, EVIDENCIANDO AS ESPÉCIES CONTIDAS EM CADA GAIOLA E O LOCAL DE COLETA.

ESPÉCIE	NOME COMUM	ORDEM	LOCAL DE COLETA
<i>Carduelis magellanicus</i> <i>Coryphospingus cucullatus</i> <i>Euphonia chalybea</i> <i>Sicalis flaveola</i> <i>Sporophila caerulescens</i> <i>Sporophila nigricollis</i>	Pintassilgo Tico-tico-rei Cais-cais Canário-da-terra-verdadeiro Coleirinho Baiano	Passeriformes	CETAS PUCPR/IBAMA
<i>Carduelis magellanicus</i> <i>Coryphospingus cucullatus</i> <i>Sicalis flaveola</i> <i>Sporophila caerulescens</i> <i>Votatina jacarina</i> <i>Zonotrichia capensis</i>	Pintassilgo Tico-tico-rei Canário-da-terra-verdadeiro Coleirinho Tiziu Tico-tico	Passeriformes	CETAS PUCPR/IBAMA
<i>Carduelis magellanicus</i> <i>Sporophila caerulescens</i>	Pintassilgo Coleirinho	Passeriformes	CETAS PUCPR/IBAMA
<i>Columbina talpacoti</i> <i>Coryphospingus cucullatus</i> <i>Geopelia cuneata</i> <i>Moluthrus banariensis</i> <i>Zenaida auriculata</i>	Rolinha Tico-tico-rei Rolinha-diamante Chopim Avoante	Columbiforme Passeriforme Columbiforme Passeriforme Columbiforme	CETAS PUCPR/IBAMA
<i>Estrilda astrild</i> <i>Sicalis flaveola</i> <i>Votatina jacarina</i> <i>Zonotrichia capensis</i>	Bico-de-lacre-comum Canário-da-terra-verdadeiro Tiziu Tico-tico	Passeriformes	CETAS PUCPR/IBAMA
<i>Gnorimopsar chopi</i> <i>Moluthrus banariensis</i>	Melro Chopim	Passeriformes	CETAS PUCPR/IBAMA
<i>Lonchura striata domestica</i> <i>Melopsittacus undulatus</i>	Manon Periquito-australiano	Passeriforme Psittaciforme	Aviário de Curitiba
<i>Oryzoborus angolensis</i> <i>Sicalis flaveola</i> <i>Sporophila caerulescens</i>	Curió Canário-da-terra-verdadeiro Coleirinho	Passeriformes	CETAS PUCPR/IBAMA
<i>Paroaria dominicana</i> <i>Sicalis flaveola</i> <i>Zonotrichia capensis</i>	Galo-da-campina Canário-da-terra-verdadeiro Tico-tico	Passeriformes	CETAS PUCPR/IBAMA
<i>Passerina brissonii</i> <i>Sicalis flaveola</i> <i>Sporophila caerulescens</i>	Azulão Canário-da-terra-verdadeiro Coleirinho	Passeriformes	CETAS PUCPR/IBAMA
<i>Sicalis flaveola</i> <i>Sporophila frontalis</i> <i>Zonotrichia capensis</i>	Canário-da-terra-verdadeiro Pichochó Tico-tico	Passeriformes	CETAS PUCPR/IBAMA

Continua

TABELA 3 – AMOSTRAS DE EXCRETA PROVENIENTES DE GAIOLAS COLETIVAS DE PASSERIFORMES E PSITTACIFORMES COLETADAS NO CETAS PUCPR/IBAMA E AVIÁRIOS DE CURITIBA, EVIDENCIANDO AS ESPÉCIES CONTIDAS EM CADA GAIOLA E O LOCAL DE COLETA.

ESPÉCIE	NOME COMUM	ORDEM	LOCAL DE COLETA
<i>Sicalis flaveola</i> <i>Zonotrichia capensis</i>	Canário-da-terra-verdadeiro Tico-tico	Passeriformes	CETAS PUCPR/IBAMA
<i>Sicalis flaveola</i> Híbrido entre <i>S. canarius</i> e <i>C. magellanicus</i>	Canário-da-terra-verdadeiro Pintagol	Passeriformes	CETAS PUCPR/IBAMA
<i>Sporophila caerulescens</i> <i>Sporophila falcirostris</i>	Coleirinho Cigarra-verdadeira	Passeriformes	CETAS PUCPR/IBAMA

TABELA 4 – AMOSTRAS POSITIVAS PARA *C. neoformans* PROVENIENTES DE EXCRETAS ORIUNDAS DE GAIOLAS DE PASSERIFORMES E PSITTACIFORMES DO CETAS PUCPR/IBAMA E AVIÁRIOS DE CURITIBA.

NÚMERO DA AMOSTRA	NÚMERO DE AVES NA GAIOLA	ESPÉCIE	NOME COMUM
02	01	<i>Sporophila sp.</i> ⁽¹⁾	
04	10	<i>Columbina talpacoti</i> <i>Coryphospingus cucullatus</i> <i>Molothrus banariensis</i> <i>Zenaida auriculata</i> <i>Geopelia cuneata</i>	Rolinha ⁽²⁾ Tico-tico-rei Chopim Avoante ⁽²⁾ Rolinha-diamante ⁽²⁾
05	01	<i>Myiopsitta monachus</i>	Caturrita
06	01	<i>Sicalis flaveola</i>	Canário-da-terra-verdadeiro
07	01	<i>Sicalis flaveola</i>	Canário-da-terra-verdadeiro
08	01	<i>Sicalis flaveola</i>	Canário-da-terra-verdadeiro
09	01	<i>Sicalis flaveola</i>	Canário-da-terra-verdadeiro
11	11	<i>Sicalis flaveola</i>	Canário-da-terra-verdadeiro
19	02	<i>Zonotrichia capensis</i> <i>Sicalis flaveola</i>	Tico-tico Canário-da-terra-verdadeiro
20	01	<i>Sicalis flaveola</i>	Canário-da-terra-verdadeiro
30	01	<i>Zonotrichia capensis</i>	Tico-tico
34	02	<i>Sporophila caerulescens</i>	Coleirinho
35	01	<i>Sporophila caerulescens</i>	Coleirinho
37	01	Híbrido entre <i>Serinus canarius</i> e <i>Carduelis magellanicus</i>	Pintagol
44	01	<i>Oryzoborus angolensis</i>	Curió
54	04	<i>Sporophila frontalis</i>	Pichochó
65	01	<i>Zonotrichia capensis</i>	Tico-tico
97	02	<i>Carduelis magellanicus</i>	Pintassilgo
118	01	<i>Melopsittacus undulatus</i> ⁽³⁾	Periquito-australiano
133	01	<i>Saltator similis</i>	Trinca-ferro-verdadeiro
134	01	<i>Platycichla flavipes</i>	Sabiá-una
136	01	<i>Platycichla flavipes</i>	Sabiá-una
137	01	<i>Turdus albicollis</i>	Sabiá-coleira
138	01	<i>Platycichla flavipes</i>	Sabiá-una
141	01	<i>Passerina brissonii</i>	Azulão
142	01	<i>Paroaria coronata</i>	Cardeal
143	01	<i>Turdus albicollis</i>	Sabiá-coleira
144	01	<i>Paroaria coronata</i>	Cardeal

Continua

TABELA 4 – AMOSTRAS POSITIVAS PARA *C. neoformans* PROVENIENTES DE EXCRETAS ORIUNDAS DE GAIOLAS DE PASSERIFORMES E PSITTACIFORMES DO CETAS PUCPR/IBAMA E AVIÁRIOS DE CURITIBA.

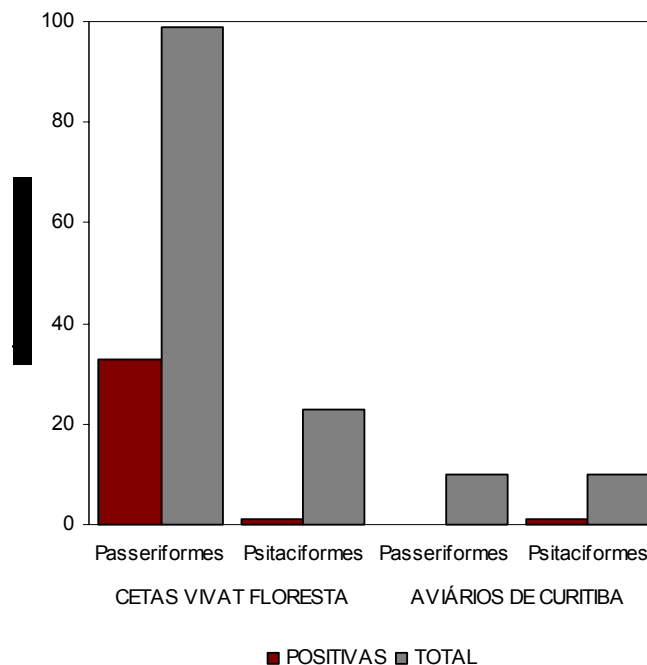
NÚMERO DA AMOSTRA	NÚMERO DE AVES NA GAIOLA	ESPÉCIE	NOME COMUM
147	01	<i>Turdus rufiventris</i>	Sabiá-laranjeira
148	01	<i>Turdus albicollis</i>	Sabiá-coleira
149	06	<i>Sicalis flaveola</i>	Canário-da-terra-verdadeiro
		<i>Sporophila frontalis</i>	Pichochó
		<i>Zonotrichia capensis</i>	Tico-tico
150	06	<i>Sicalis flaveola</i>	Canário-da-terra-verdadeiro
		<i>Sporophila caerulensis</i>	Coleirinho
		<i>Oryzoborus angolensis</i>	Curió
151	02	<i>Gnorimopsar chopi</i>	Melro
157	04	<i>Gnorimopsar chopi</i>	Melro
		<i>Molothrus banariensis</i>	Chopim
160	03	<i>Sporophila frontalis</i>	Pichochó
		<i>Sporophila falcirostris</i>	Patativa
165	02	<i>Sporophila caerulensis</i>	Coleirinho

(1) Indivíduo identificado ao nível de gênero, sem definição de espécie.

(2) Animal pertencente à Ordem Columbiforme

(3) Única amostra positiva isolada a partir de aviário localizado em Curitiba

GRÁFICO 1 – HISTOGRAMA DA RELAÇÃO DO NÚMERO DE AMOSTRAS POSITIVAS, E TOTAL, DE EXCRETAS DE PASSERIFORMES E PSITTACIFORMES PROVENIENTES DO CETAS PUCPR/IBAMA E DE AVIÁRIOS DE CURITIBA



Do total das amostras, 25,53% (36/141) foram consideradas positivas, sendo 24,11% (34/141) provenientes de Passeriformes e 1,42% (2/141) de Psittaciformes. Considerando-se o total de amostras coletadas, o número de positivas provenientes de Passeriformes (35/141) foi significativamente maior que os obtidos a partir de excretas de Psittaciformes (2/141) ($P \leq 0,01$). Não foi observada

diferença significativa entre o número de isolados obtidos a partir do CETAS PUCPR/IBAMA e os Aviários de Curitiba ($P \leq 0,1$) (TABELA 5). Não houve uniformidade de coleta no número de amostras entre as Ordens estudadas e os locais de origem das mesmas, pois a amostragem era dependente da chegada das aves ao CETAS ou da disponibilidade das mesmas nos Aviários de Curitiba, sem haver possibilidade de escolha. Sendo assim, o número de amostras coletadas a partir de Passeriformes foi superior.

TABELA 5 – RESUMO DOS DADOS DE RELEVÂNCIA OBTIDOS NO PRESENTE ESTUDO.

Local de Coleta	CETAS PUCPR/IBAMA				Aviários de Curitiba				Total			
	Positivas		Coletadas		Positivas		Coletadas		Positivas		Coletadas	
	VA	%	VA	%	VA	%	VA	%	VA	%	VA	%
Passeriformes	34 ^a	27,87 ^a	99	81,15	0 ^a	0 ^a	9	47,37	34 ^a	24,11 ^a	108	76,6
Psittaciformes	1 ^b	0,82 ^b	23	18,85	1 ^a	5,26 ^a	9	47,37	2 ^b	1,42 ^b	32	22,69
Coletiva ⁽¹⁾	0	0	0	0	0	0	1	5,26	0	0	1	0,71
Total	35	28,69	122	100	1	5,26	19	100	36	25,53	141	100

NOTA: VA: Valor absoluto

(1) Passeriformes e Psittaciformes alojados na mesma gaiola

a/b: diferença estatística significativa na mesma coluna

Dentre as amostras coletadas, 90 (63,83%) eram provenientes de gaiolas que continham somente uma ave, 37 (26,24%) de gaiolas com mais de uma ave da mesma espécie e 14 (9,93%) de gaiolas com mais de uma espécie. Não foi encontrada diferença significativa entre isolamento do fungo em gaiolas com um ou mais indivíduos da mesma espécie ($P \leq 1$) e nem se comparado isolamentos em gaiolas com uma ou mais espécies dentro dela ($P \leq 1$).

Das amostras positivas, nove (25%) eram provenientes de gaiolas que continham canários-da-terra-verdadeiro alojados individual ou coletivamente. Assim como para o canário-da-terra-verdadeiro, outras espécies também apresentaram substancial número de isolados, estando alojadas tanto em gaiolas individuais como coletivas, sendo elas: coleirinho (4/36 – 11,11%), tico-tico (4/36 – 11,11%), sabiá-coleira (3/36 – 8,33%), sabiá-una (3/36 – 8,33%), pichochó (2/36 – 5,56%), chopim (2/36 – 5,56%), curió (2/36 – 5,56%), melro (2/36 – 5,56%) e cardeal (2/36 – 5,56%) (TABELA 4). Apesar de haver uma maior tendência numérica de positividade com relação a algumas espécies, tal diferença não foi considerada significativa na análise estatística realizada. Cabe ressaltar que não houve uniformidade no número de

amostras obtidas de cada espécie, sendo que o número de amostras coletadas a partir de canário-da-terra-verdadeiro e coleirinho foi maior, devido a representatividade dessas espécies em apreensões.

Quanto à procedência das aves que chegaram ao CETAS, das quais se obteve as amostras, 62,3% foram provenientes de Curitiba e região metropolitana (Almirante Tamandaré, Colombo e São José dos Pinhais), 11,48% do litoral (Alexandra, Antonina, Guaratuba, Matinhos, Morretes, Paranaguá), 9,02% de Londrina, 0,82% de Irati, 4,92% de outros estados e 11,48% sem procedência conhecida (GRÁFICO 2). Obteve-se 85,71% (30/35) das amostras positivas a partir de aves de procedência de Curitiba e região metropolitana, 11,43% (4/35) do litoral paranaense e 2,86% (1/35) de Londrina (GRÁFICO 3). A quantidade de isolados variou de acordo com a região de procedência das aves, entretanto não houve diferença estatística entre o número de isolados positivos conforme a região de origem das aves.

GRÁFICO 2 – PROCEDÊNCIA DAS AVES QUE CHEGARAM AO CETAS, CUJAS EXCRETAS FORAM COLETADAS PARA POSTERIOR ISOLAMENTO DE *C. neoformans* E *C. gattii*

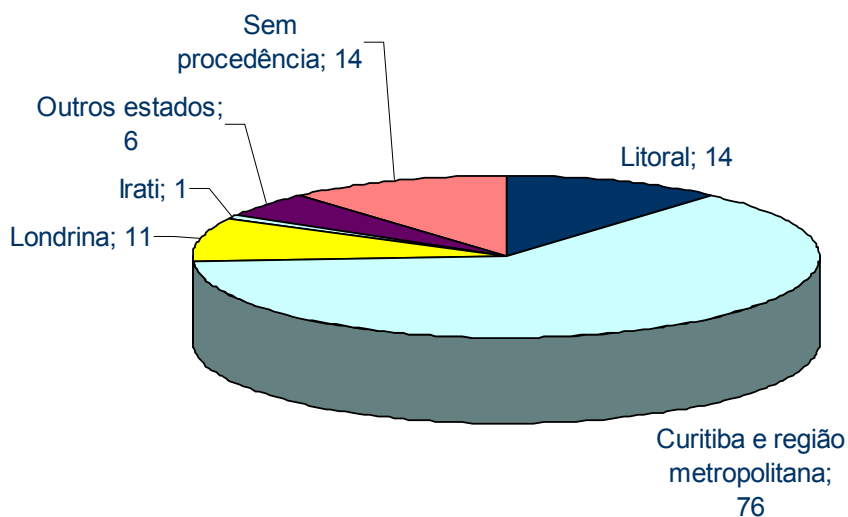
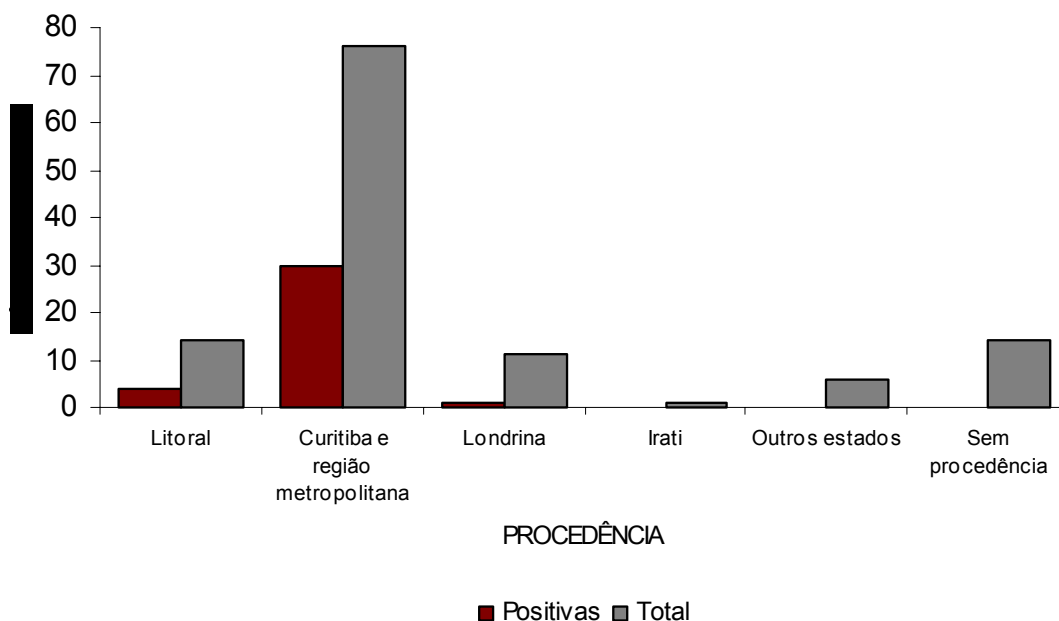


GRÁFICO 3 – AMOSTRAS POSITIVAS E TOTAIS DE EXCRETA PASSERIFORMES E PSITTACIFORMES, CONFORME PROCEDÊNCIA DAS AVES



De 15 de outubro de 2004 a 02 de julho de 2006, foram obtidas 119 amostras cloacais de aves provenientes do CETAS PUCPR/IBAMA (TABELA 6), sendo que 50,42% (60/119) eram provenientes de Passeriformes e 49,58% (59/119) de Psittaciformes, totalizando 24 espécies. Nenhuma amostra se mostrou positiva. Segundo a análise estatística realizada, demonstrou-se diferença significativa entre o número de isolados obtidos a partir de excreta e de cloaca ($P \leq 0,01$).

TABELA 6 – AMOSTRAS COLETADAS A PARTIR DA CLOACA DE PASSERIFORMES E PSITTACIFORMES PROVENIENTES DO CETAS PUCPR/IBAMA, EVIDENCIANDO O NÚMERO DE AMOSTRAS DE CADA ESPÉCIE E A ORDEM A QUE PERTENCEM.

NOME CIENTÍFICO	NOME COMUM	ORDEM	NÚMERO DE AMOSTRAS
<i>Amazona aestiva</i>	Papagaio-verdadeiro	Psittaciforme	28
<i>Amazona amazonica</i>	Papagaio-do-mangue	Psittaciforme	4
<i>Amazona brasiliensis</i>	Papagaio-de-cara-roxa	Psittaciforme	1
<i>Amazona vinacea</i>	Papagaio-de-peito-roxo	Psittaciforme	11
<i>Ara ararauna</i>	Arara-canindé	Psittaciforme	4
<i>Brotogeris tirica</i>	Periquito-rico	Psittaciforme	4
<i>Carduelis magellanicus</i>	Pintassilgo	Passeriforme	2
<i>Coryphospingus cucullatus</i>	Tico-tico-rei	Passeriforme	3
<i>Haplospiza unicolor</i>	Cigarra-bambú	Passeriforme	1
<i>Euphonia violácea</i>	Gaturamo-verdadeiro	Passeriforme	1
<i>Gnorimopsar chopi</i>	Melro	Passeriforme	7
<i>Icterus cayanensis</i>	Encontro	Passeriforme	1
<i>Passerina brissonii</i>	Azulão	Passeriforme	4
<i>Platicyclha flavipes</i>	Sabiá-una	Passeriforme	2
<i>Pionopsitta pileata</i>	Cuiú-cuiú	Psittaciforme	2
<i>Pionus maximiliani</i>	Maitaca-de-maximiliano	Psittaciforme	5
<i>Saltator similis</i>	Trinca-ferro	Passeriforme	4
<i>Sicalis flaveola</i>	Canário-da-terra-verdadeiro	Passeriforme	11
<i>Sporophila caerulescens</i>	Coleirinho	Passeriforme	7
<i>Sporophila frontalis</i>	Pichochó	Passeriforme	10
<i>Sporophila lineola</i>	Bigodinho	Passeriforme	2
<i>Turdus</i> sp.	Sabiá ⁽¹⁾	Passeriforme	1
<i>Turdus rufiventris</i>	Sabiá-laranjeira	Passeriforme	2
<i>Zonotrichia capensis</i>	Tico-tico	Passeriforme	2
TOTAL			119

(1) Indivíduo identificado ao nível de gênero, sem definição de espécie.

Vinte e quatro amostras provenientes de ingluvío foram coletadas, no dia 02 de julho de 2006, por meio de *swabs*, sendo 33,33% (8/24) provenientes de Passeriformes e 66,67% (16/24) de Psittaciformes, totalizando 10 espécies diferentes (TABELA 7). Nenhuma amostra oriunda de ingluvío se mostrou positiva, demonstrando diferença estatística significativa entre o número de isolados de excreta e de ingluvío ($P \leq 0,025$).

TABELA 7 – AMOSTRAS COLETADAS A PARTIR DO INGLÚVIO DE PASSERIFORMES E PSITTACIFORMES PROVENIENTES DO CETAS PUCPR/IBAMA, EVIDENCIANDO O NÚMERO DE AMOSTRAS DE CADA ESPÉCIE E A ORDEM A QUE PERTENCEM.

NOME CIENTÍFICO	NOME COMUM	ORDEM	NÚMERO DE AMOSTRAS
<i>Amazona aestiva</i>	Papagaio-verdadeiro	Psittaciforme	8
<i>Brotogeris tirica</i>	Periquito-rico	Psittaciforme	4
<i>Carduelis magellanicus</i>	Pintassilgo	Passeriforme	1
<i>Passerina brissonii</i>	Azulão	Passeriforme	1
	Cuiú-cuiú	Psittaciforme	2
<i>Pionopsitta pileata</i>			
<i>Pionus maximiliani</i>	Maitaca-de-maximiliano	Psittaciforme	2
<i>Pitylus fuliginosus</i>	Pimentão	Passeriforme	1
<i>Saltator similis</i>	Trinca-ferro	Passeriforme	3
<i>Sicalis flaveola</i>	Canário-da-terra-verdadeiro	Passeriforme	1
<i>Turdus rufiventris</i>	Sabiá-laranjeira	Passeriforme	1
TOTAL			24

5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS DE EXCRETA DE PASSERIFORMES E PSITTACIFORMES

5.2.1 Caracterização Morfológica, Bioquímica e Sorológica dos Isolados

Todos os isolados obtidos a partir de excretas acumuladas em gaiolas de Passeriformes e Psittaciformes eram compostos por leveduras ovais a globosas pouco encapsuladas (FIGURA 6), positivas quanto à capacidade de produção de melanina em ágar Níger (FIGURA 7), termotolerantes à 37°C, produtoras de urease em até 48 h após o repique (FIGURA 8) e sensíveis à cicloheximida, comprovando-se, assim, as características básicas de virulência das amostras.

O perfil de assimilação de compostos de carbono e nitrogênio demonstrou que todos os isolados ambientais assimilaram dextrose, sacarose, maltose, trealose, dulcitol, inositol, D-xilose, e peptona e não assimilaram lactose, melibiose e nitrato de potássio. Para os outros açúcares (celobiose, D-galactose e rafinose), houve assimilação variável (FIGURA 9). Esse padrão bioquímico correspondeu ao perfil de *C. neoformans* e *C. gattii* (KONEMAN e ROBERTS, 1985; SIDRIM e MOREIRA, 1999).

O cultivo no meio CGB se apresentou negativo para todos os isolados (FIGURA 10), demonstrando-se que todos os isolados a partir de excretas eram pertencentes ao *C. neoformans*.

FIGURA 6 – MICROMORFOLOGIA DOS ISOLADOS DE *C. neoformans* PROVENIENTES DE EXCRETAS DE PASSERIFORMES E PSITTACIFORMES



FIGURA 7 – MACROMORFOLOGIA DOS ISOLADOS DE *C. neoformans* EM ÁGAR NÍGER, DEMONSTRANDO A ATIVIDADE FENOLOXIDASE



FIGURA 8 – DEMONSTRAÇÃO DA PRODUÇÃO DA ENZIMA UREASE, ESPECÍFICA PARA O GÊNERO *Cryptococcus*. AMOSTRAS À DIREITA COM COLORAÇÃO RÓSEA SÃO POSITIVAS



FIGURA 9 – AUXANOGRAMA, DEMONSTRANDO OS HALOS MACROSCÓPICOS DE CRESCIMENTO AO REDOR DE DISCOS DE AÇÚCARES

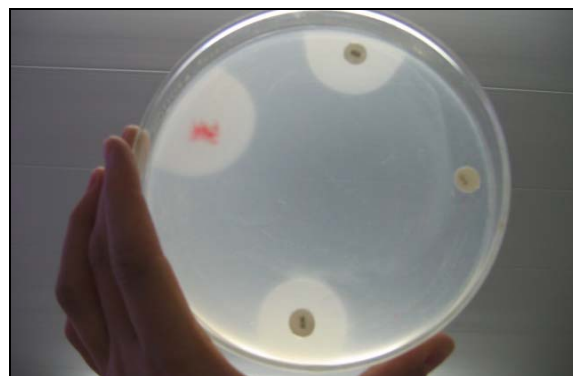


FIGURA 10 – CULTIVO EM MEIO CGB DE ISOLADOS AMBIENTAIS. DA ESQUERDA PARA A DIREITA: CONTROLE NEGATIVO, CONTROLE POSITIVO E AMOSTRA PROVENIENTE DE EXCRETAS

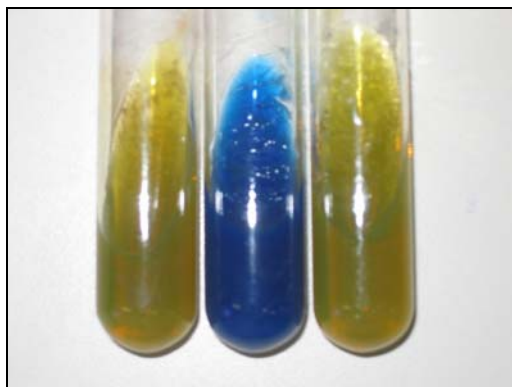


FIGURA 11 – AGLUTINAÇÃO EM LÁTEX PARA DETECÇÃO DE ANTÍGENOS CAPSULARES. DA ESQUERDA PARA A DIREITA, NA FILEIRA DE CIMA: CONTROLE POSITIVO, CONTROLE NEGATIVO, AMOSTRAS AMBIENTAIS (54 e 97)

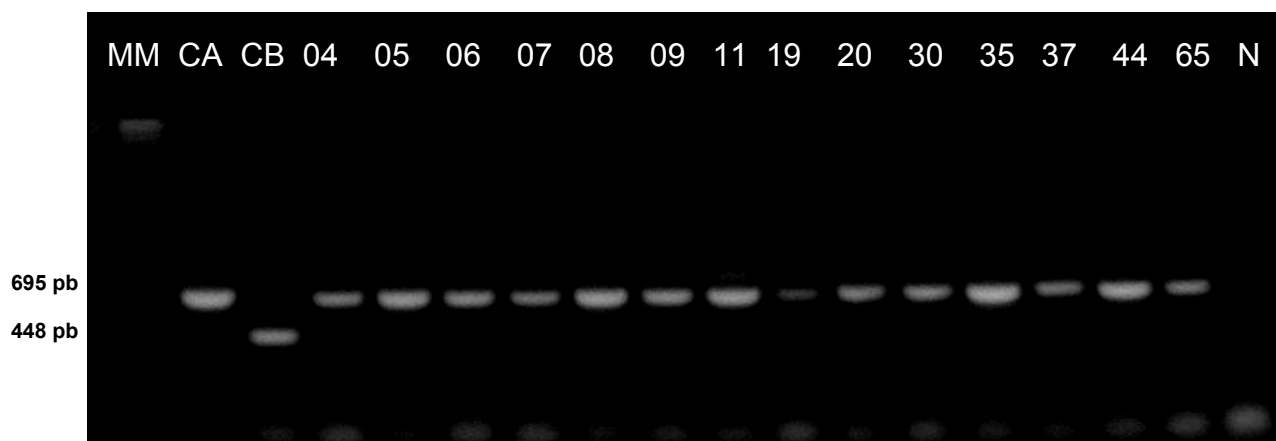


Quanto à sorologia realizada com o *kit* comercial *Latex-Cryptococcus Antigen Detection System*, demonstrou-se aglutinação, confirmando o resultado positivo para *C. neoformans* e/ou *C. gattii* (FIGURA 11).

5.2.2 Caracterização Molecular dos Isolados

A PCR *multiplex* para determinar a espécie dos isolados ambientais, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores CNA 70A, CNA 70S, CNB 49A e CNB 49S originou produtos de 695 pb, sendo todos os isolados considerados *C. neoformans*, confirmando os resultados obtidos através do CGB (FIGURA 12).

FIGURA 12 – EXEMPLO REPRESENTATIVO DE AMPLIFICAÇÃO NA PCR *MULTIPLEX* UTILIZANDO OS PARES DE OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES CNA 70A E CNA 70S (ESPECÍFICOS PARA *C. neoformans*), CNB 49A E CNB 49S (ESPECÍFICOS PARA *C. gattii*). O TAMANHO MOLECULAR DAS BANDAS FORMADAS ESTÁ EVIDENCIADO NO LADO ESQUERDO DA FIGURA. DA ESQUERDA PARA DIREITA: MARCADOR MOLECULAR λ /HINDIII 564-23130pb (MM), AMOSTRA DE REFERÊNCIA WM 148 (*C. neoformans*) (CA), AMOSTRA DE REFERÊNCIA WM 161 (*C. gattii*) (CB), ISOLADOS DE EXCRETAS DE PASSERIFORMES E PSITTACIFORMES (05-65) E CONTROLE NEGATIVO (N)



A PCR *fingerprinting* com os mini e microssatélites M13 e (GACA)₄ das amostras ambientais apresentaram a maioria das bandas semelhantes ao padrão VNI, sendo pertencentes ao sorotipo A (FIGURA 13 e 14). Quanto à PCR para a determinação do tipo reprodutivo, houve amplificação de produtos de 101 bp, correspondente ao MAT α (FIGURA 15).

FIGURA 13 – EXEMPLO REPRESENTATIVO DE AMPLIFICAÇÃO DA PCR *FINGERPRINTING* EM AMOSTRAS AMBIENTAIS E CLÍNICAS DE *C. neoformans*, UTILIZANDO A SEQUÊNCIA MINISSATÉLITE M13. ESQUERDA PARA DIREITA: MARCADOR MOLECULAR λ /HINDIII 564-23130pb (MM), AMOSTRA DE REFERÊNCIA WM 148 (*C. neoformans*, SOROTIPO A, VNI) (A), AMOSTRA DE REFERÊNCIA WM 161 (*C. gattii*, VGIII) (B), ISOLADOS DE EXCRETAS DE PASSERIFORMES E PSITTACIFORMES (02-37), AMOSTRAS CLÍNICAS (309-318) E CONTROLE NEGATIVO (N)

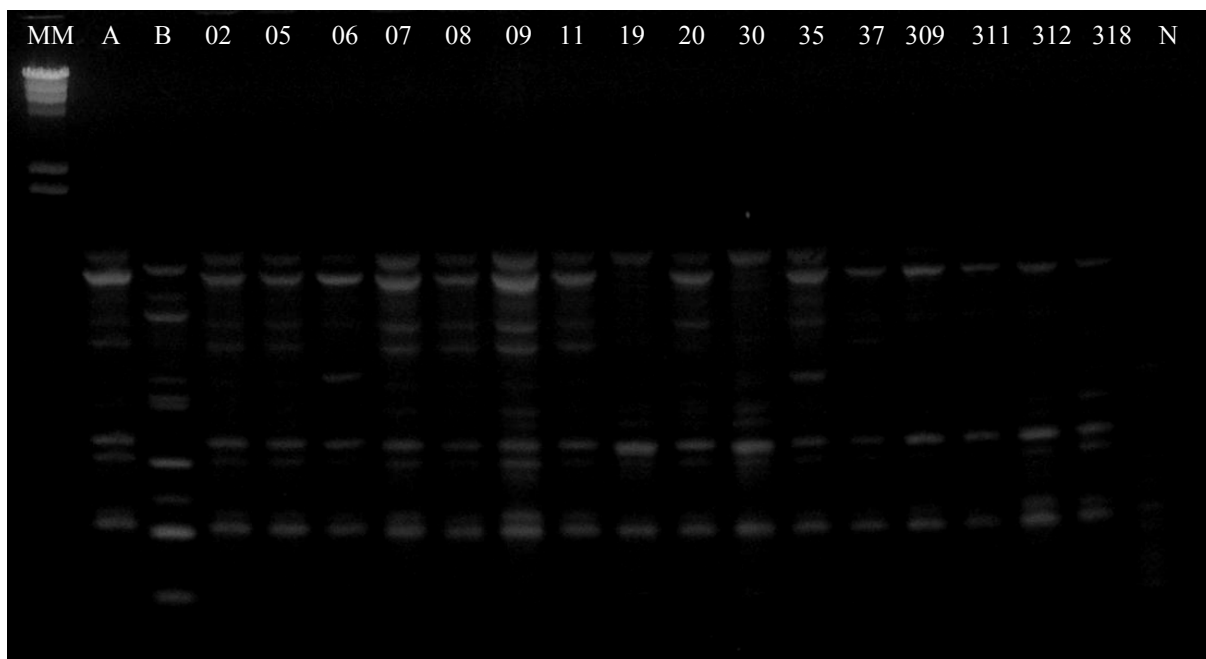


FIGURA 14 – EXEMPLO REPRESENTATIVO DE AMPLIFICAÇÃO DA PCR *FINGERPRINTING* EM AMOSTRAS AMBIENTAIS E CLÍNICAS DE *C. neoformans* E *C. gattii*, UTILIZANDO A SEQUÊNCIA MICROSSATÉLITE (GACA)₄. ESQUERDA PARA DIREITA: MARCADOR MOLECULAR λ /HINDIII 564-23130pb (MM), AMOSTRA DE REFERÊNCIA WM 148 (*C. neoformans*, SOROTIPO A, VNI) (A), AMOSTRA DE REFERÊNCIA WM 179 (*C. gattii*, VGI) (B), ISOLADOS DE EXCRETAS DE PASSERIFORMES E PSITTACIFORMES (118-157), AMOSTRAS CLÍNICAS (324-335) E CONTROLE NEGATIVO (N)

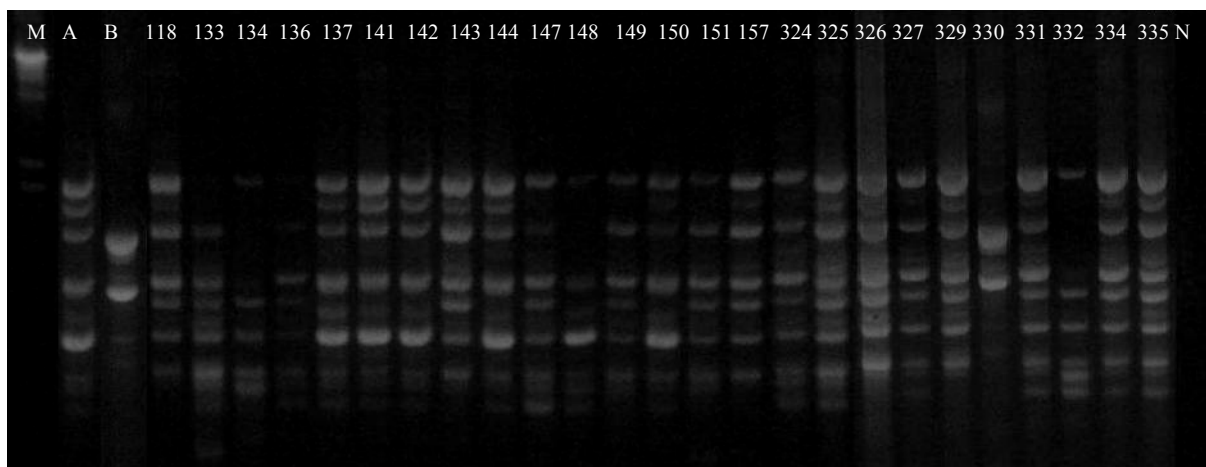
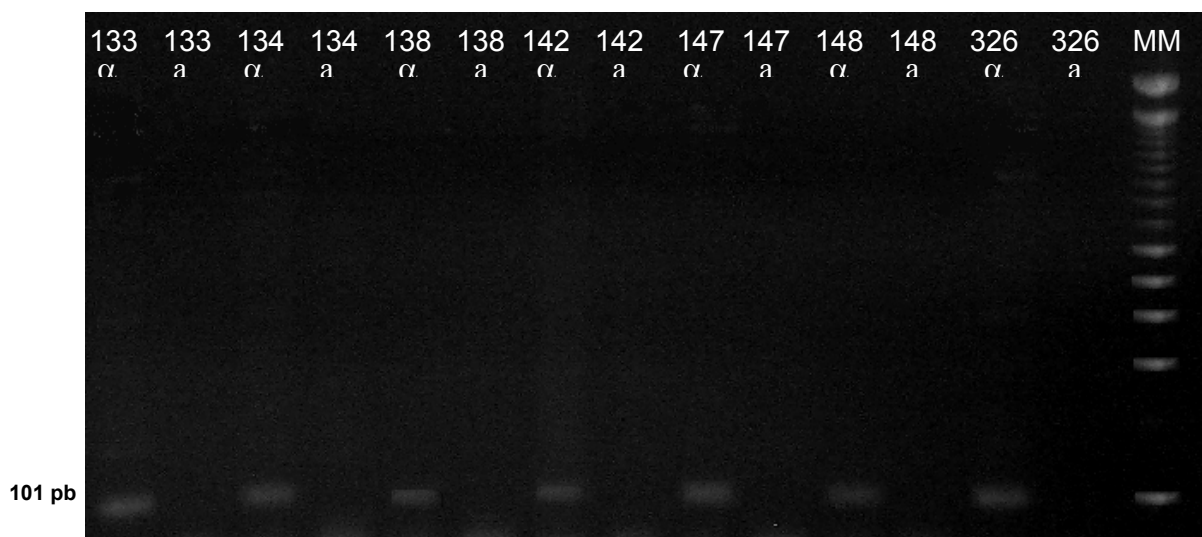


FIGURA 15 – EXEMPLO REPRESENTATIVO DE AMPLIFICAÇÃO DA PCR PARA DETERMINAÇÃO DO TIPO REPRODUTIVO EM AMOSTRAS AMBIENTAIS E CLÍNICAS DE *C. neoformans*, COM OS PARES DE OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES $\alpha 1$ E $\alpha 2$, ESPECÍFICOS PARA MAT α , E a1 E a2, ESPECÍFICOS PARA MATa, QUE AMPLIFICAM PRODUTOS DE 101pb E 117pb, RESPECTIVAMENTE. O TAMANHO MOLECULAR DAS BANDAS FORMADAS ESTÁ EVIDENCIADO NO LADO ESQUERDO DA FIGURA. DA ESQUERDA PARA DIREITA: ISOLADOS DE EXCRETAS DE PASSERIFORMES E PSITTACIFORMES (133-148), ISOLADO CLÍNICO (326) E MARCADOR MOLECULAR 100 pb (Invitrogen) (MM)



5.3 EPIDEMIOLOGIA E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E MOLECULAR DOS ISOLADOS CLÍNICOS

Das 25 amostras de casos clínicos de seres humanos obtidas a partir da Micoteca do Laboratório de Micologia, utilizadas nesse estudo no intuito de compará-las às amostras obtidas a partir de excretas de Passeriformes e Psittaciformes, 32% (8/25) eram pertencentes a indivíduos do sexo feminino e 68% (17/25) a indivíduos do sexo masculino, equivalendo a uma proporção de 1:2,125, sem haver predisposição sexual ($P \leq 0,2$). A idade variou entre 17 a 57 anos, com média de $34,48 \pm 10,26$. Quanto ao fator predisponente, 17 (68%) pacientes eram soropositivos para o HIV, 2 (8%) recebiam tratamento imunossupressor, 1 (4%) possuía neoplasia linfoproliferativas e 1 (4%) possuía outras doenças. Em quatro (16%) pacientes não foi determinado o fator predisponente. Sendo assim, a aids foi o fator predisponente mais prevalente ($P \leq 0,01$). Vinte e um isolados (84%) foram obtidos a partir do LCR, três do sangue (12%) e um a partir do LCR e sangue (4%). A maioria dos isolados (96%) foi pertencente a *C. neoformans* conforme resultados do subcultivo em CGB e PCR *multiplex*. Todos os isolados de casos clínicos em

seres humanos foram pertencentes ao VNI (*C. neoformans*, sorotipo A), exceto a amostra 330, pertencente ao VGI (*C. gattii*). A única amostra pertencente a *C. gattii* era proveniente de um paciente sem causa imunocomprometedora determinada. Assim como os isolados ambientais, todos os isolados clínicos corresponderam ao MAT α (TABELA 8).

TABELA 8 – AMOSTRAS CLÍNICAS HUMANAS PROVENIENTES DA MICOTECA DO LABORATÓRIO DE MICOLOGIA, SETOR DE MICROBIOLOGIA, HOSPITAL DE CLÍNICAS, UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, UTILIZADAS PARA COMPARAÇÃO MOLECULAR COM AMOSTRAS AMBIENTAIS DE EXCRETAS DE AVES, EVIDENCIANDO O NÚMERO DA AMOSTRA, SEXO E IDADE DO INDIVÍDUO, FATOR PREDISPONENTE (FP), MATERIAL DE ONDE FOI OBTIDO O ISOLADO, RESULTADO DO CGB, PCR *multiplex* (MUL), PCR *fingerprinting* (FIN) e *mating type* (MAT).

AMOSTRA	SEXO	IDADE	FP	MATERIAL	CGB	MUL	FIN	MAT
307	F	31 a	I	LCR	-	<i>C. neoformans</i>	VNI	α
308	F	22 a	HIV	Sangue	-	<i>C. neoformans</i>	VNI	α
309	F	36 a	HIV	LCR	-	<i>C. neoformans</i>	VNI	α
310	M	30 a	HIV	LCR/sangue	-	<i>C. neoformans</i>	VNI	α
311	M	34 a	HIV	LCR	-	<i>C. neoformans</i>	VNI	α
312	M	39 a	HIV	LCR	-	<i>C. neoformans</i>	VNI	α
313	M	38 a	HIV	LCR	-	<i>C. neoformans</i>	VNI	α
315	F	38 a	HIV	LCR	-	<i>C. neoformans</i>	VNI	α
316	M	30 a	HIV	LCR	-	<i>C. neoformans</i>	VNI	α
317	M	42 a	HIV	LCR	-	<i>C. neoformans</i>	VNI	α
318	M	32 a	HIV	LCR	-	<i>C. neoformans</i>	VNI	α
319	M	29 a	HIV	LCR	-	<i>C. neoformans</i>	VNI	α
320	M	I	I	LCR	-	<i>C. neoformans</i>	VNI	α
322	F	17 a	IMU	Sangue	-	<i>C. neoformans</i>	VNI	α
323	M	33 a	HIV	LCR	-	<i>C. neoformans</i>	VNI	α
324	M	36 a	HIV	LCR	-	<i>C. neoformans</i>	VNI	α
325	F	23 a	HIV	LCR	-	<i>C. neoformans</i>	VNI	α
326	M	19 a	Hodgkin's	LCR	-	<i>C. neoformans</i>	VNI	α
329	M	28 a	HIV	Sangue	-	<i>C. neoformans</i>	VNI	α
330	M	52 a	-	LCR	+	<i>C. gattii</i>	VGI	α
331	M	41 a	I	LCR	-	<i>C. neoformans</i>	VNI	α
332	M	I	I	LCR	-	<i>C. neoformans</i>	VNI	α
333	F	57 a	IMU	LCR	-	<i>C. neoformans</i>	VNI	α
334	F	54 a	HIV, DII, HT, IRC	LCR	-	<i>C. neoformans</i>	VNI	α
335	M	32 a	HIV	LCR	-	<i>C. neoformans</i>	VNI	α

NOTA: a = anos; DII = Diabetes mellitus tipo II; F = feminino; HIV = Vírus da Imunodeficiência Humana; HT = Hipertensão; I = indeterminado(a); IMU= imunossupressor; IRC = Insuficiência renal crônica; LCR = Líquido cefalorraquidiano; M = masculino.

5.4 ANTIGENEMIA EM PSITTACIFORMES

Nos dias 09 e 15 de junho de 2006, foram obtidas 29 amostras de sangue para a subsequente avaliação sorológica de Psittaciformes (TABELA 9), as quais

foram processadas no dia 30 de junho de 2006. Todas as amostras mostraram resultado negativo, isto é, uma suspensão homogênea de partículas sem a visualização de formação de grumos, após comparação com os controles positivo e negativo.

TABELA 9 – AMOSTRAS DE SANGUE PROVENIENTES DE PSITTACIFORMES DO CETAS PUCPR/IBAMA, EVIDENCIANDO O NÚMERO DE AMOSTRAS OBTIDA DE CADA ESPÉCIE.

NOME CIENTÍFICO	NOME COMUM	LOCAL DE COLETA	NÚMERO DE AMOSTRAS
<i>Amazona aestiva</i>	Papagaio-verdadeiro	CETAS PUCPR/IBAMA	24
<i>Ara ararauna</i>	Arara-canindé	CETAS PUCPR/IBAMA	02
<i>Pionus maximiliani</i>	Maitaca-de-maximiliano	CETAS PUCPR/IBAMA	03
TOTAL			29

FIGURA 16 – FOTO DEMONSTRATIVA DA AGLUTINAÇÃO EM LÁTEX PARA DETECÇÃO DE ANTÍGENOS CAPSULARES NO SORO DE PSITTACIFORMES. 1) CONTROLE POSITIVO; 2) CONTROLE NEGATIVO; 3-8) AMOSTRAS DE SORO APRESENTANDO UMA SUSPENSÃO HOMOGÊNEA DE PARTÍCULAS SEM A VISUALIZAÇÃO DE FORMAÇÃO DE GRUMOS APÓS A MISTURA COM O LÁTEX, SENDO CONSIDERADAS NEGATIVAS



6 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nesse estudo evidenciam, pela primeira vez, o isolamento de *C. neoformans* em excretas de Passeriformes e Psittaciformes no estado do Paraná e demonstram a importância das excretas dessas aves como reservatório de *C. neoformans* no ambiente e, conseqüentemente, na epidemiologia da criptococose. QUEIROZ-TELLES *et al.* (1998) realizaram uma tentativa de isolamento de *Cryptococcus* spp. a partir de excretas de aves em Curitiba, entretanto não obtiveram isolados a partir de excretas de Psittaciformes.

A frequência de isolamento de *C. neoformans* a partir de excretas de Passeriformes e Psittaciformes no presente estudo (25,53%), foi maior do que o encontrado anteriormente por PASSONI *et al.* (1998) (12,7%) e ABEGG *et al.* (2006) (18,18%) e menor do FILIÚ *et al.* (2002), que obteve 50% das amostras coletadas positivas. Uma alta frequência de isolamento foi obtida no presente trabalho, se comparada a de outro estudo recente realizado na Malásia por TAY *et al.* (2005), que isolaram somente uma única amostra positiva de 112 amostras de gaiolas de um zoológico e nenhuma positiva proveniente de *pet shops*.

A diferença metodológica limitou a comparação dos resultados, porém a presença de *C. neoformans* nas excretas de aves pode variar conforme a dieta, condições de manutenção do animal, comportamento de cada espécie e aspectos climáticos de cada região (PASSONI *et al.*, 1998; CAFARCHIA *et al.*, 2006a). Outro fator de potencial importância na obtenção de isolados positivos para *C. neoformans* é o crescimento rápido de fungos contaminantes, especialmente zigomicetos, o que possibilita haver resultados falso-negativos pela metodologia empregada (SWINNE-DESGAIN, 1975; KOBAYASHI *et al.*, 2005). Fungos filamentosos e leveduriformes foram encontrados em grande quantidade nas placas de Petri, devido possivelmente à alta contaminação do ambiente dessas aves, o que pode ter influenciado na obtenção de resultados negativos. SWINNE-DESGAIN (1975) observou que o número de colônias de *C. neoformans* e/ou *C. gattii* é inversamente proporcional ao número de outras colônias de outras leveduras contidas nas placas de Petri.

Apesar de haver representação de outras partes do estado do Paraná, grande parte das amostras positivas de excretas, coletadas no CETAS, foi obtida a partir de Passeriformes e Psittaciformes provenientes de Curitiba e região metropolitana. Com

os dados obtidos no presente estudo, não há como saber se existe alguma região ou município dentro do estado que possibilite a recuperação mais efetiva de *C. neoformans*, já que não houve uniformidade de coleta de amostras provenientes de diferentes regiões do estado, pois a mesma foi conduzida de acordo com a chegada dos animais no CETAS. Cabe ressaltar que a procedência do animal não corresponde à trajetória epidemiológica e que muitas espécies apreendidas em Curitiba têm diferentes origens. Além disso, não pode ser determinado o momento da contaminação das excretas, podendo essa ter ocorrido no local de origem da ave, no transporte ou até mesmo dentro das instalações do CETAS. Apesar da coleta das amostras ter sido realizada logo após a chegada das apreensões, não se pode descartar que o próprio ambiente do CETAS tenha promovido a contaminação das excretas.

Apesar disso, a diversidade topográfica, natural e climatológica de Curitiba e região metropolitana e Tijucas do Sul pode contribuir positivamente no processo de recuperação da levedura. A região do Primeiro Planalto, onde estão situados os municípios de Curitiba e Tijucas do Sul, possui clima subtropical úmido com verão brando. Esse clima, com temperaturas amenas e frias e umidade elevada no ano todo possibilita o desenvolvimento de *C. neoformans*. Adicionalmente a altitude também é favorável ao desenvolvimento de *C. neoformans* (QUINTERO *et al.*, 2005). QUINTERO *et al.* (2005) encontraram maior frequência de isolados em regiões de clima frio (com temperatura de 12 a 18°C), em altitudes que variavam de 2.000 a 3.000 m. O clima subtropical pode agir como inibidor do crescimento de *C. gattii* em amostras ambientais nesse estado, já que o microrganismo cresce melhor em clima tropical (NISHIKAWA *et al.*, 2003). Apesar disso, ABEGG *et al.* (2006) obtiveram *C. gattii* a partir de amostras de excreta de aves no Rio Grande do Sul.

Sabe-se que *C. neoformans* e *C. gattii* são mais freqüentemente isolados e em maiores densidades nos meses mais quentes e chuvosos do ano (GRANADOS e CASTAÑEDA, 2005). ABEGG *et al.* (2006) não obtiveram nenhum isolamento no inverno, estação mais fria do Rio Grande do Sul. No presente estudo, observou-se uma tendência de isolamento de *C. neoformans* nos meses de primavera, entretanto esses dados podem não refletir a realidade, devido a não uniformidade de coleta de amostras durante cada estação e a pouca quantidade de amostras coletadas no verão e inverno. Apesar da primavera e verão serem as estações de temperatura e

umidade mais elevadas no Primeiro Planalto Paranaense e o outono e o inverno caracterizados por baixas temperaturas e meses mais secos, as faixas de temperatura e umidade ao longo dos anos não são fixas, variando ano após ano, o que impossibilita a comparação de índice de isolamento por estação do ano. O ideal seria comparar o índice de isolamento à variação de temperatura e pluviosidade, o que ficou restrito no presente trabalho pela falta de distribuição de amostras ao longo do ano.

A maior parte dos isolados foi pertencente às excretas de Passeriformes e somente duas amostras foram provenientes de excretas de Psittaciformes. Apesar de não haver diferença estatística significativa, observou-se que o canário-da-terra-verdadeiro foi a espécie que apresentou o maior número de isolados (25% das amostras positivas). A amostra 04 foi a única obtida a partir de uma gaiola que continha Passeriformes associados a Columbiformes, apresentando-se positiva. A obtenção de resultados positivos dissimilares entre as Ordens pode ter sido influenciada pela diferença do número de amostras coletadas de cada espécie. Infelizmente não se manteve a uniformidade de obtenção de um número fixo para cada espécie, pois se contou com o número de aves contidas em cada aviário de Curitiba e o número de apreensões que chegavam ao CETAS. O número de espécimes apreendidos por ano depende da intensidade de fiscalização e das apreensões realizadas em cada estado brasileiro pelas instituições responsáveis. Segundo a RENCTAS (2001), somente 9% dos animais apreendidos são encaminhados para CETAS e não há uma sistematização, planejamento adequado e recursos suficientes para as operações de fiscalização.

Apesar dessa diferença no número de amostras ser marcante, as excretas de algumas espécies podem oferecer melhores condições de sobrevivência e multiplicação de *C. neoformans* (CASADEVALL e PERFECT, 1998; PASSONI *et al.*, 1998; ABEGG *et al.*, 2006), devido à composição química das excretas, ciclo endosaprobótico, adaptações bioquímicas, co-infecção com bactérias, fungos e parasitos que competem com a levedura no bolo fecal, incidência luminosa, diferente habitat das aves, assim como hábitos alimentares, reprodutivos e sanitários diferentes (CASADEVALL e PERFECT, 1998; PASSONI *et al.*, 1998). Segundo CAFARCHIA *et al.* (2006b), a distribuição de leveduras ao longo do aparelho digestório também é influenciada pelas características anatomo-fisiológicas de cada

espécie. Mesmo o pH da dieta pode influenciar a taxa de recuperação do fungo nas excretas (ABEGG *et al.*, 2006). ABOU-GABAL e ATIA (1978) relatam que, *in vitro*, o crescimento de *C. neoformans* é cinco vezes maior em meios contendo excretas de pombos a de galinhas.

Apesar de, em excretas de pombos, *C. neoformans* possuir a habilidade de assimilar creatinina como fonte de nitrogênio (KNOW-CHUNG, 1991), isolados provenientes de excretas de canários mostram pequena ou quase ausente capacidade de assimilar creatinina. A utilização de ácido úrico e de duas purinas (xantina e guanina), pode funcionar como substituta de nutrientes para o patógeno, sendo que esses componentes estão contidos em proporções diferentes nas excretas de cada espécie (CASADEVALL e PERFECT, 1998; KIELSTEIN *et al.*, 2000). Levando em consideração o grande número de isolados obtidos no presente estudo, as excretas de Passeriformes e Psittaciformes parecem ser propícias para o desenvolvimento do microrganismo, porém não se sabe se existem e quais são os fatores responsáveis pela preferência de crescimento nas diferentes espécies ou Ordens estudadas.

Como foi citado, as excretas de aves, por conterem compostos ricos em nitrogênio, favorecem o crescimento da levedura (STAIB, 1962b; CASALI *et al.*, 2001) e têm sido extensivamente pesquisadas como fonte de *Cryptococcus* spp. Excretas de répteis, anfíbios e peixes também possuem esses compostos em altas concentrações, entretanto seu papel na propagação e disseminação da criptococose ainda não foi registrado, talvez pela pequena importância desses animais na epidemiologia da criptococose. Apesar da pouca importância dada ao fato, KROCKENBERGER *et al.* (2002) já isolaram *C. gattii* a partir de detritos de recinto de lagartos.

Outro fator que pode ter influenciado na obtenção de resultados positivos desiguais dentre as espécies pesquisadas foi níveis diferentes de umidade das excretas. As excretas úmidas ou frescas raramente contêm o fungo, pois essa condição é favorável ao crescimento de bactérias, as quais pela decomposição, alcalinizam o meio, não possibilitando a sobrevivência do fungo, além de funcionarem como fortes competidores (MITCHELL e PERFECT, 1995; FERREIRA e DE ÁVILA, 1996; SORRELL e ELLIS, 1997; CHEE e LEE, 2005; GRANADOS e CASTAÑEDA, 2005; KOBAYASHI *et al.*, 2005). Os basidiósporos são resistentes à

dessecação (SORREL e ELLIS, 1997) e quando dessecadas, as excretas de pombos permitem a viabilidade de *C. neoformans* por até dois anos (CASALI *et al.*, 2001). Além disso, nas excretas dessecadas de aves, o fungo pode crescer em densidades que ultrapassam 60 milhões de organismos por mililitro (NOSANCHUK *et al.*, 2000).

A maioria dos espécimes coletados de Psittaciformes era proveniente de excretas úmidas ou frescas, pois as condições sanitárias das gaiolas desses animais que chegavam ao CETAS PUCPR/IBAMA eram melhores e isso pode ter contribuído para o baixo índice de isolamento nessa Ordem. MANCIANTI *et al.* (2001) também não observaram *C. neoformans* e *C. gattii* em isolados de leveduras de 325 amostras de excretas frescas de Psittaciformes. Paradoxalmente, BAUWENS *et al.* (1986), citam que o material fecal de Psittaciformes é uma importante fonte de *C. neoformans*, pois essas aves têm uma relação com madeira bem próxima, nidificando em ocos de árvores e fragmentando poleiros, o que pode contribuir para a sua contaminação. ABEGG *et al.* (2006) isolaram amostras positivas somente a partir de excretas de Psittaciformes, apesar de terem realizado uma extensiva busca em outras classes taxonômicas. Os resultados positivos observados em maior quantidade para Passeriformes a Psittaciformes possivelmente também estão relacionados com o teor de umidade das excretas, as quais estavam acumuladas em maior quantidade e dessecadas em recintos de Passeriformes. As condições de manutenção de Passeriformes em cativeiro normalmente são mais precárias do que as de Psittaciformes. Esses normalmente são mantidos como animais de estimação e os proprietários, geralmente, não deixam as gaiolas acumularem grande quantidade de excretas. Enquanto que, em gaiolas de Passeriformes, a limpeza é realizada, normalmente, uma vez por semana. Além disso, as excretas de alguns Passeriformes parecem ser mais passíveis à dessecação do que as de Psittaciformes. Esses dois fatores aliados podem fazer com que as excretas de Passeriformes sejam mais propícias ao desenvolvimento de *C. neoformans*, como observado no presente estudo.

A alta contaminação observada nas gaiolas de aves provenientes do CETAS pode estar relacionada com o grande número de gaiolas, a superpopulação, a forma de limpeza das gaiolas com a mesma ferramenta, insuficiente aeração e a grande disponibilidade de sementes de níger, painço, alpiste e girassol, que podem servir de

substrato para o crescimento do fungo (SWINNE-DESGAIN, 1975; FILIÚ *et al.*, 2002). Segundo SWINNE-DESGAIN (1975), o acúmulo dessas leveduras se deve à falta de limpeza em ambientes protegidos e favoráveis à multiplicação do fungo, ambiente esse encontrado em gaiolas que chegam de apreensão, com grande quantidade de animais e em péssimas condições sanitárias. A limpeza e a desinfecção contínua podem ter contribuído para o baixo nível de isolamento encontrado em aviários de Curitiba. A única amostra positiva era proveniente do aviário que possuía as piores condições sanitárias. Isso também pode ter influenciado a não obtenção de diferença significativa de isolamento entre Passeriformes e Psittaciformes quando se considerou somente os aviários de Curitiba, já que todas as gaiolas recebiam o mesmo regime de limpeza, não importando a Ordem. Considerando que a dispersão dos fungos pode ocorrer por meio de correntes de ar, roedores, baratas, ácaros e insetos, ambientes sem condições sanitárias favorecem o desenvolvimento de *C. neoformans* (PASSONI *et al.*, 1998).

As aves em cativeiro, normalmente, são mantidas em locais fechados, protegidos da ação de chuvas e raios ultravioletas, o que possibilita a dessecação das excretas, a sobrevivência, disseminação e aerossolubilização de *C. neoformans* (LAZERA *et al.*, 1998; MONTENEGRO e PAULA, 2000; GRANADOS e CASTAÑEDA, 2005), o que as torna extremamente importantes na cadeia epidemiológica da doença.

Com relação ao estudo micológico, cabe ressaltar que o padrão morfológico, bioquímico e sorológico dos isolados foram semelhantes aos encontrados na literatura (KONEMAN e ROBERTS, 1985; KNOW-CHUNG e BENNET, 1992; MITCHELL e PERFECT, 1995; CASADEVALL e PERFECT, 1998; SIDRIM e MOREIRA, 1999; CASALI *et al.*, 2003; ABEGG *et al.*, 2006). Todos os isolados foram capazes de sintetizar melanina, a qual corresponde a um fator de virulência importante, já que, do ponto de vista molecular comprovou-se que uma deleção no gene da melanina diminui a patogenicidade do fungo (QUINTERO *et al.*, 2005). A urease regula o pH, facilitando o estabelecimento do fungo dentro do hospedeiro. Essa enzima esteve presente em todas as amostras positivas. Para ser patogênico um organismo deve ter capacidade de crescer na temperatura corporal (CASADEVALL e PERFECT, 1998). Nesse trabalho, todos os isolados foram

termotolerantes à 37°C. As células leveduriformes obtidas no presente estudo possuíam cápsulas mínimas, o que é comum em amostras ambientais, e pode facilitar a dessecação, aerosolubilização do fungo e infecção do hospedeiro (MITCHELL e PERFECT, 1995; CASADEVALL e PERFECT, 1998).

No presente estudo não se obteve qualquer amostra positiva a partir da cloaca das aves. Esse resultado corrobora com outros autores, que obtiveram pouca ou nenhuma recuperação do fungo em amostras cloacais (SWINNE-DESGAIN, 1975; ROSARIO *et al.*, 2005; CAFARCHIA *et al.*, 2006a; CAFARCHIA *et al.*, 2006b). O que pode ser explicado facilmente pela temperatura alta das aves e a alcalinização das excretas que não favorecem o crescimento do fungo nesse local (SORREL e ELLIS, 1997). Ao contrário do que foi observado em pombos (SWINNE-DESGAIN, 1975), no presente trabalho, não foi possível isolar *C. neoformans* e *C. gattii* do ingluvío de Passeriformes e Psittaciformes. A grande quantidade de fungos filamentosos oportunistas evidenciados nas placas com ágar Níger pode ter influenciado os resultados, entretanto, sugere-se que a mucosa do ingluvío e cloaca de Passeriformes e Psittaciformes raramente é colonizada por *C. neoformans* e *C. gattii*.

Analisando os resultados da presente investigação, observando-se a discrepância de resultados positivos obtidos a partir das excretas e cloaca e ingluvío, reforça-se, então, que *C. neoformans* não é um habitante natural do aparelho digestório de aves e que sua fonte natural é o solo ou ar e o microrganismo encontra nas excretas de aves um substrato rico em compostos nitrogenados, ótimo para o seu crescimento (CASADEVALL e PERFECT, 1998; CHEE e LEE, 2005). O próprio alimento da ave pode constituir uma fonte de infecção para as excretas (ABEGG, 2003; CAFARCHIA *et al.*, 2006b).

Excretas de pombos não infectadas se tornam infectadas quando expostas ao ar contendo células aerosolubilizadas de *C. neoformans* (CASADEVALL e PERFECT, 1998). KROCKENBERGER *et al.* (2002) observaram que coalas sem colonização nasal por *C. gattii* quando transferidos para locais com alta prevalência ambiental de *C. gattii* tornavam-se persistentemente colonizados. O resultado obtido nesse estudo, aliado à afirmação desses autores, confirma a suposição de contaminação ambiental das excretas.

A soroepidemiologia em seres humanos demonstra que a doença clínica é incomum, sendo o contato com o fungo muito mais freqüente, chegando a 20% da população adulta, a qual demonstra anticorpos ao antígeno capsular (MITCHEL e PERFECT, 1995; SPEED *et al.*, 1993¹³ apud MALIK *et al.*, 1997). Neste estudo, procurou-se avaliar a capacidade de invasão sistêmica do fungo e a presença de infecções subclínicas através da antigenemia de Psittaciformes. A não detecção de antígenos capsulares no soro Psittaciformes descartou a infecção subclínica prévia e o estado de portadoras assintomáticas de *Cryptococcus* spp., reforçando a hipótese que *Cryptococcus* spp. não invade o organismo das aves, sendo um colonizador de suas excretas, provindo de uma fonte ambiental que não o organismo das aves. MALIK *et al.* (1997) também observaram resultados negativos na antigenemia de cães e gatos que apresentavam colonização da cavidade nasal por *C. neoformans*, demonstrando baixa capacidade invasiva do fungo em animais imunocompetentes, assim como CONNOLLY *et al.* (1999) que obtiveram resultados negativos na antigenemia para a maioria dos coalas com colonização persistente da cavidade nasal por *Cryptococcus* spp. Deve-se levar em consideração, também, que os raros resultados falso-negativos na aglutinação em látex são provenientes de pacientes com infecção localizada (MEDLEAU *et al.*, 1990) e que esse é o tipo predominante em infecção em Psittaciformes (MALIK *et al.*, 2003).

Apesar de excretas de pombos serem o reservatório mais importante para *Cryptococcus* spp., os isolados obtidos em grande quantidade (25,53%) a partir de excretas de Passeriformes e Psittaciformes, os quais têm contato direto ou indireto com pessoas em suas residências, aviários ou zoológicos aumentam a exposição ao fungo, e conseqüentemente, o risco de aquisição da doença (GRANADOS e CASTAÑEDA, 2005). O contato de crianças e idosos é freqüente com esses animais e esta parcela da população é considerada mais sensível à aquisição de doenças oportunistas (CAFARCHIA *et al.*, 2006a). A presença de *C. neoformans* no ambiente doméstico pode favorecer a infecção e re-infecção pelo fungo, especialmente para pessoas imunocomprometidas (SWINNE *et al.*, 1989; STAIB, 1992; WEGENER e STAIB, 1993; PASSONI *et al.*, 1998; NOSANCHUCK *et al.*, 2000; LAGROU *et al.*,

¹³ SPEED, B.R.; CAIRNS, B.; KALDOR, J. The seroepidemiology of *Cryptococcus neoformans* utilising class-specific antibodies detected by enzyme immunoassay. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON CRYPTOCOCCUS AND CRYPTOCOCCOSIS, 2, 1993, Milan. **Program and Abstracts**. Milan: Organizing Committee, 1993. p.2-6.

2005). Conforme PASSONI *et al.* (1998), pacientes com aids expostos a esporos de *C. neoformans* em ambiente domiciliar apresentam duas vezes mais chances de contrair a doença a pacientes não expostos. Mesmo para indivíduos imunocompetentes, pode haver infecção quando ocorre exposição a grande quantidade de inóculo (MITCHELL e PERFECT, 1995). Além disso, sabe-se que o contato com pombos, outras aves e suas excretas aumenta os níveis de anticorpos anti-criptocócicos séricos, sendo mais prevalente em criadores de pombos do que na população em geral (CASADEVALL e PERFECT, 1998).

Os resultados obtidos através da PCR *multiplex*, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores CNA 70A, CNA 70S, CNB 49A, CNB 49S foram capazes de discernir as espécies de *Cryptococcus* spp. e foram concordantes com os resultados obtidos pela quimiotipagem, empregando o meio CGB. Esses resultados corroboram com aqueles obtidos por HORTA *et al.* (2002) e CASALI *et al.* (2003).

Nesse estudo, a PCR *fingerprinting* foi utilizada para detectar a distribuição dos tipos moleculares encontrados nas amostras ambientais e verificar se esses correspondiam aos encontrados em isolados clínicos da mesma área geográfica. Todos os isolados ambientais foram provenientes do tipo molecular VNI, correspondente ao sorotipo A, consistente com o fato de *C. neoformans* var. *grubii* ser mais prevalente em isolados ambientais (CASALI *et al.*, 2003; MEYER *et al.*, 2003; NISHIKAWA *et al.*, 2003; DELGADO *et al.*, 2005; KOBAYASHI *et al.*, 2005; SOARES *et al.*, 2005; TAY *et al.*, 2005; ABEGG *et al.*, 2006). Segundo GRANADOS e CASTAÑEDA (2005), o alto pH dos excrementos pode explicar a ausência de *C. gattii* em excretas de aves e a presença da variedade *grubii*. No entanto, ABEGG *et al.* (2006) isolaram a partir de excretas de Psittaciformes além de *C. neoformans* VNI, *C. gattii*, VGI, em 13% dos isolados. Todos os isolados clínicos e ambientais foram pertencentes ao MAT α , estando de acordo com outros estudos que apontam este tipo reprodutivo 30 a 40 vezes mais prevalente que o MATa (KNOW-CHUNG e BENNETT, 1992; CHATURVEDI *et al.*, 2000; OHKUSU *et al.*, 2002; CASALI *et al.*, 2003; TRILLES *et al.*, 2003; LITVINTSEVA *et al.*, 2005; TAY *et al.*, 2005; ABEGG *et al.*, 2006).

Relacionando-se os resultados obtidos de excretas de Passeriformes e Psittaciformes com amostras clínicas, observou-se que todas as amostras

ambientais eram pertencentes à variedade *grubii*, assim como a maioria das amostras clínicas, com o mesmo padrão de bandas (VNI). A análise de *fingerprinting* e *mating type* demonstrou que as amostras clínicas e ambientais são semelhantes, concordando com outros estudos realizados previamente (MEYER *et al.*, 1999; CASALI *et al.*, 2003; DELGADO *et al.*, 2005) e comprovando que os isolados ambientais obtidos nesse estudo têm potencial para provocar a infecção em seres humanos, já que correspondem ao mesmo padrão molecular daqueles isolados em infecções clínicas. Entretanto não há como determinar se as excretas de aves foram responsáveis pela infecção de algum indivíduo, pois *C. neoformans* é cosmopolita e associado a grande variedade de nichos. Além disso, a infecção por *Cryptococcus* spp. pode ser adquirida quando o indivíduo ainda é jovem, permanecendo latente até que um evento imunossupressor faça com que a infecção seja reativada (ROZENBAUM e GONÇALVES, 1994; ABEGG, 2003).

Os dados epidemiológicos obtidos a partir das amostras clínicas estão de acordo com estudos prévios realizados no território brasileiro e no mundo, confirmando que a doença ocorre em maior frequência em homens adultos e que a aids é o maior fator predisponente para a aquisição da doença (ROZENBAUM e GONÇALVES, 1994; MITCHELL e PERFECT, 1995; LOPES *et al.*, 1997; FERNANDES *et al.*, 2000, 2003; MEYER *et al.*, 2003; LITVINTSEVA *et al.*, 2005; MOREIRA *et al.*, 2006). Como a maioria dos isolados foi obtida a partir de pacientes com aids e demonstrou-se prevalência de VNI, reforça-se que esse tipo molecular é predominante em pacientes soropositivos para o HIV, inclusive no estado do Paraná. Obteve-se a maioria dos isolados a partir do LCR e sangue, que confirma a manifestação da doença, que na maioria das vezes se dá como meningoencefalite ou meningite e, ainda, disseminada (ROZENBAUM *et al.*, 1992; ROZENBAUM e GONÇALVES, 1994; CASALI *et al.*, 2003). ABEGG (2003) explica a maior prevalência clínica de *C. neoformans* var. *grubii*, pela maior frequência de isolados ambientais da mesma variedade.

O único isolado clínico pertencente ao *C. gattii* apresentou padrão de bandas semelhante ao VGI, o qual não havia sido encontrado previamente em amostras clínicas na Região Sul do Brasil. Em outras regiões do país *C. gattii* VGI e VGII já foram relatados (IGREJA *et al.*, 2004; MEYER *et al.*, 2003). No Rio Grande do Sul, CASALI *et al.* (2003) observaram, em amostras clínicas, somente VNI e VGIII. A

comparação entre os dados fica complicada devido ao reduzido número de amostras clínicas analisadas no presente estudo, entretanto ABEEG *et al.* (2006) obtiveram, a partir de excretas de Psittaciformes no RS, *C. gattii* VGI, o mesmo tipo molecular encontrado na única amostra pertencente a *C. gattii* no estado do Paraná, mostrando então, que as excretas de Psittaciformes podem representar um fator de risco para a aquisição de criptococose por *C. gattii*. Os resultados moleculares obtidos no presente estudo concordam com estudos previamente realizados, já que os genótipos VNI e VGI são encontrados em maior prevalência no mundo todo (ABEGG, 2003; ABEGG *et al.*, 2006).

As aves são os animais encontrados em maior quantidade no comércio ilegal de animais silvestres, por serem preferidas pelos comerciantes e pela riqueza da avifauna nacional. Os Passeriformes são as aves mais comuns em cativeiro em todo o mundo. A intensa captura de Passeriformes no Brasil é direcionada ao mercado interno, que sempre manteve especial predileção por aves de gaiola, sendo os pássaros canoros as espécies mais encontradas em cativeiro no país. A manutenção dessas aves em cativeiro é tradição muito antiga e arraigada no Brasil (RENTAS, 2001). Os Psittaciformes, devido à habilidade de imitar a voz humana, combinada com a inteligência, beleza e docilidade, são as aves mais procuradas como animal de estimação no mundo. O Brasil é o país de maior diversidade em Psittaciformes (SICK, 1997). Uma pesquisa realizada pelo IBOPE Opinião (IBOPE, 2005), mostrou que 30% dos entrevistados possuem ou já mantiveram animais silvestres em suas residências, sendo que, desses, a maioria compreende aves, especialmente Passeriformes. Com esses dados, demonstra-se a importância que os Passeriformes e Psittaciformes possuem como animais de estimação no território brasileiro, sendo preferidos pela maioria da população. Levando em consideração a grande quantidade dessas aves em ambientes domiciliar e público (*pet shops* e zoológicos), as mesmas podem representar uma importante fonte de infecção para seres humanos e outros mamíferos, especialmente imunocomprometidos, já que todos os isolados foram pertencentes ao *C. neoformans* var. *grubii*.

Devido à importância das excretas como reservatórios e fonte de infecção por *C. neoformans*, o controle profilático deve ser mais vigoroso. Sugere-se que medidas de minimização de exposição ao *C. neoformans*, especialmente em locais de circulação pública, domicílios de pacientes imunocomprometidos e locais de grandes

concentrações de aves, por meio da manutenção das condições de higiene, aeração, iluminação e ventilação adequadas, bem como a monitorização dos locais de risco, devem ser priorizadas (FILIÚ *et al.*, 2002; ABEGG *et al.*, 2006). A simples limpeza do ambiente, eliminando o resto de excretas e alimento pode ser eficiente, entretanto o uso de agentes alcalinizantes, como por exemplo, o hipoclorito de sódio, pode evitar a manutenção e crescimento do microrganismo no ambiente (CASADEVALL e PERFECT, 1998).

Levando-se em consideração a importância dos resultados obtidos nesse estudo, e considerando a necessidade de ampliação da pesquisa abrangendo outras áreas e sub-áreas da micologia ambiental de *C. neoformans* e *C. gattii*, determinou-se alguns pontos a serem pesquisados futuramente, dentre eles: correlacionar os fatores climáticos e topográficos encontrados no estado do Paraná ao índice de isolamento ambiental em diferentes regiões; verificar possível sazonalidade da criptococose e da recuperação ambiental de *Cryptococcus* spp. no estado do Paraná; relacionar os fatores que contribuem para o crescimento dessas leveduras em cada espécie aviária; evidenciar outras fontes de *Cryptococcus* spp. ainda desconhecidas, como excretas de peixes, anfíbios e répteis; realizar culturas extensivas de ingluvío e cloaca, com maior número de amostras, de diversas espécies, incluindo Columbiformes, para evidenciar as diferenças de isolamento entre as mesmas; avaliar a importância dos fatores que podem influenciar nos resultados obtidos quanto à colonização cloacal e de ingluvío de Passeriformes e Psittaciformes, relacionando ambiente, hospedeiro e virulência e patogenicidade do agente, obtendo-se a verdadeira importância desses fatores no entendimento da relação do *Cryptococcus* spp. e as diferentes espécies de aves; coletar amostras do ambiente, ar e alimento para verificar a principal fonte ambiental de *Cryptococcus* spp. nas excretas de aves; estabelecer a epidemiologia clínica da criptococose no estado do Paraná, desenvolvendo estudos mais abrangentes, e; realizar pesquisas mais intensivas para identificar *C. gattii* em excretas de aves no estado do Paraná.

7 CONCLUSÕES

A partir de excretas acumuladas em gaiolas de Passeriformes e Psittaciformes provenientes do tráfico de animais selvagens no estado do Paraná e de aviários de Curitiba pôde-se isolar *C. neoformans* var. *grubii*, evidenciando que a forma de manutenção destes animais em cativeiro e o acúmulo de excretas podem ser responsáveis pelo crescimento e dispersão do fungo no ambiente domiciliar e urbano, podendo ser, outra importante fonte do patógeno para pacientes imunocomprometidos.

As excretas de Passeriformes tiveram maior tendência de manter *C. neoformans* no ambiente, devido, provavelmente, às baixas condições sanitárias em que essas aves se encontravam, que possibilitam a dessecação das excretas.

Todas as amostras de excretas de Passeriformes e Psittaciformes, bem como a maioria das amostras clínicas provenientes de seres humanos foram pertencentes à variedade *grubii* MAT α , sugerindo-se o envolvimento das excretas de aves na disseminação ambiental de *C. neoformans*, agindo como um fator de risco a mais para pacientes imunocomprometidos para a aquisição da doença.

Demonstrou-se taxa nula de recuperação de *C. neoformans* a partir de amostras cloacais e de ingluvío, sugerindo-se que o fungo está presente no meio ambiente e encontra condições favoráveis de sobrevivência e crescimento nas excretas de aves, o que possibilita sua manutenção e disseminação. Sendo assim, o fungo não endosaprobótico dessas aves, nas condições encontradas nesse estudo.

A antigenemia negativa de Psittaciformes demonstrou a baixa capacidade de invasão sistêmica do fungo no organismo dessas aves, descartando a presença de infecção subclínica e o estado de carreador assintomático e comprovando que *C. neoformans* age somente como colonizador das excretas dessas aves.

Confirma-se que a variedade *grubii* é prevalente em amostras provenientes de casos clínicos em seres humanos, assim como evidenciado em outros estudos nacionais e internacionais. Além disso, segundo os dados epidemiológicos obtidos nesse estudo, *C. neoformans* atinge, na sua maioria, pacientes adultos e imunocomprometidos, sendo que a forma mais comum da doença é meningoencefalite.

REFERÊNCIAS

ABEGG, M.A. **Isolamento e caracterização de *Cryptococcus neoformans* a partir de potenciais reservatórios ambientais inexplorados no Rio Grande do Sul**. Rio Grande do Sul, 2003. 82 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular), Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

ABEGG, M.A.; CELLA, F.L.; FAGANELLO, J.; VALENTE, P.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* isolated from the excreta of psittaciformes in a southern Brazilian zoological garden. **Mycopathologia**, v.161, n.2, p.83-91, 2006.

ABOU-GABAL, M.; ATIA, M. Study of the role of pigeons in the dissemination of *Cryptococcus neoformans* in nature. **Sabourandia**, v.16, p.63-8, 1978.

AOKI, F. H.; IMAI, T.; TANAKA, R.; MIKAMI, Y.; TAGUCHI, H.; NISHIMURA, N. F.; NISHIMURA, K.; MIYAJI, M.; SCHREIBER, A. Z.; BRANCHINI, M. L. M. New PCR primer pairs specific for *Cryptococcus neoformans* serotype A or B prepared on the basis of Random Amplified Polymorphic DNA fingerprint pattern analyses. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.2, p.315-20, 1999.

BAUWENS, L.; SWINNE, D.; VROEY, C.; MEURICHY, W. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in the aviaries of the Antwerp Zoological Gardens. **Mykosen**, v.29, n.7, p.291-4, 1986.

BOEKHOUT, T.; THEELAN, B.; DIAS, M.; FELL, J.W.; HOP, W.C.J.; ABELN, E.C.A.; DROMER, F.; MEYER, W. Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology**, v.147, p.891-907, 2001.

BRANDT, M.E.; HUTWAGNER, L.C.; KLUG, L.A.; BAUGHMAN, W.S.; RIMLAND, D.; GRAVISS, E.A.; HAMILL, R.J.; THOMAS, C.; PAPPAS, P.G.; REINGOLD, A.L.; PINNER, R.W. Molecular subtype distribution of *Cryptococcus neoformans* in four

areas of the United States. Cryptococcal Disease Active Surveillance Group. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, n.4, p.912-7, 1996.

BRANDT, M.E.; HUTWAGNER, L.C.; KUYKENDALL, R.J.; PINNER, R.W. Comparison of multilocus enzyme electrophoresis and random amplified polymorphic DNA analysis for molecular subtyping of *Cryptococcus neoformans*. The Cryptococcal Disease Active Surveillance Group. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, n.7, p.1890-5, 1995.

CAFARCHIA, C.; CAMARDA, A.; ROMITO, D.; CAMPOLO, M.; QUAGLIA, N.C.; TULLIO, D.; OTRANTO, D. Occurrence of yeast in cloacae of migratory birds. **Mycopathologia**, v.161, n.4, p.229-34, 2006 (a).

CAFARCHIA, C.; ROMITO, D.; IATTA, R.; CAMARDA, A.; MONTAGNA, M.T.; OTRANTO, D. Role of birds of prey as carriers and spreaders of *Cryptococcus neoformans* and other zoonotic yeasts. **Medical Mycology**, v.44, n.6, p.485-92, 2006 (b).

CALVO, B.; FISCHMAN, O.; CASTELO FILHO, A.; REIS FILHO, J.; DEL BIANCO, R.; BARBOSA, R.M.; ZAROR, L. Detección de antígeno del polisacárido capsular de *Cryptococcus neoformans* em pacientes com SIDA y neurocriptococosis em São Paulo, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.33, n.6, p.485-90, 1991.

CALVO, B.M.; COLOMBO, A.L.; FISCHMAN, O.; SANTIAGO, A.; THOMPSON, L.; LAZERA, M.S.; TELLES, F.; FUKUSHIMA, K.; NISHIMURA, K.; TANAKA, R.; MYIAJY, M.; MORETTI-BRANCHINI, M.L. Antifungal susceptibilities, varieties, and electrophoretic karyotypes of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* from Brazil, Chile, and Venezuela. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, p.2348-50, 2001.

CASADEVALL, A.; PERFECT, J. R. ***Cryptococcus neoformans***. Washington, DC: American Society for Microbiology Press, 1998. 541 p.

CASALI, A.K.; GOULART, L.; ROSA E SILVA, L.K.; RIBEIRO, A.M.; AMARAL, A.A.; ALVES, S.H.; SCHRANK, A.; MEYER, W.; VAINSTEIN, M.H. Molecular typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. **FEMS Yeast Research**, v.3, p.405-15, 2003.

CASALI, A.K.; STAATS, C.C.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. *Cryptococcus neoformans*: aspectos moleculares e epidemiológicos. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v.20, p.34-37, 2001.

CHATURVEDI, S.; RODEGHIER, B.; FAN, J.; MCCLELLAND, C.M.; WICKES, B.; CHATURVEDI, V. Direct PCR of *Cryptococcus neoformans* *MAT α* and *MATa* pheromones to determine mating types, ploidy, and variety: a tool for epidemiological and molecular pathogenesis studies. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n.5, p.2007-9, 2000.

CHEE, H.Y.; LEE, K.B. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (serotype A) from pigeon droppings in Seoul, Korea. **Journal of Microbiology**, v.43, n.5, p.469-72, 2005.

CHRISTENSEN, W. B. Urea decomposition as a means of differentiating *Proteus* and paracolon cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella* types. **Journal of Bacteriology**, v.52, p.461-6, 1946.

CICHON, M. **Suscetibilidade a drogas antifúngicas de isolados ambientais de *Cryptococcus neoformans*, procedentes da cidade de Curitiba e região metropolitana, Paraná, Brasil**. Paraná, 2006. 38 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) – Setor de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

CLIPSHAM, R.C.; BRITT, J.O. Disseminated cryptococcosis in a macaw. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v.183, p.1303-5, 1983.

CONNOLLY, J.H.; KROCKENBERGER, M.; MALIK, R.; CANFIELD, P.J.; WIGNEY, D.I.; MUIR, D.B. Asymptomatic carriage of *Cryptococcus neoformans* in the nasal cavity of the koala (*Phascolarctos cinereus*). **Medical Mycology**, v.37, p.331-8, 1999.

CORRÊA, M.P.S.C.; OLIVEIRA, E.C.; DUARTE, R.R.B.S.; PARDAL, P.P.O.; OLIVEIRA, F.M.; SEVERO, L.C. Criptococose em crianças no estado do Pará, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.32, n.5, 505-8, 1999.

CRISEO, G.; BOLIGNANO, M.S.; DE LEO, F.; STAIB, F. Evidence of canary droppings as an important reservoir of *Cryptococcus neoformans*. **Zentralblatt fuer Bakteriologie**, v.282, n.3, p.244-54, 1995.

CURRIE, B.P.; FREUNDLICH, L.F.; CASADEVALL. Restriction fragment length polymorphism analysis of *Cryptococcus neoformans* isolates from environmental (pigeon excreta) and clinical sources in New York City. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, p.1188-1192, 1994.

DARZÉ, C.; LUCENA, R.; GOMES, I.; MELO, A. Características clínicas laboratoriais de 104 casos de meningoencefalite criptocócica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.33, n.1, p.21-6, 2000.

DELGADO, A.C.N.; TAGUCHI, H.; MIKAMI, Y.; MYIAJY, M.; VILLARES, M.C.B.; MORETTI, M.L. Human cryptococcosis: relationship of environmental and clinical strains of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* from urban and rural areas. **Mycopathologia**, v.159, p.7-11, 2005.

DROMER, F.; MATHOULIN, S.; DUPONT, L.; LETENNEUR, L.; RONIN, O. and the French Cryptococcosis study group. Individual and environmental factors associated with infection due to *Cryptococcus neoformans* serotype D. **Clinical Infectious Diseases**, v.23, p.91-6, 1996.

DROMER, F.; VARMA, A.; RONIN, O.; MATHOULIN, S.; DUPONT, B. Molecular typing of *Cryptococcus neoformans* serotype D clinical isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, n.10, p.2364-71, 1994.

ELLIS, D.H.; PFEIFFER, T.J. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.28, p.1642-4, 1990.

EMMONS, C.W. Saprophytic sources of *Cryptococcus neoformans* associated with the pigeon (*Columba livia*). **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.62, p.227-232, 1955.

FENWICK, B.; TAKESHITA, K.; WONG, A. A moluccan cockatoo with disseminated cryptococcosis. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v.187, p.1218-9, 1985.

FERNANDES, O.F.L.; COSTA, T.R.; COSTA, M.R.; SOARES, A.J.; PEREIRA, A.J.S.C.; SILVA, M.R.R. *Cryptococcus neoformans* isolados de pacientes com AIDS. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.33, n.1, p.75-8, 2000.

FERNANDES, O.F.L.; PASSOS, X.S.; SOUZA, L.K.H.; MIRANDA, A.T.B.; CERQUEIRA, C.H.P.V.; SILVA, M.R.R. *In vitro* susceptibility characteristics of *Cryptococcus neoformans* varieties from AIDS patients in Goiânia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.98, n.6, p.839-41, 2003.

FERREIRA, A.W.; DE ÁVILA, S.L.M. **Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 1996. 302p.

FESSEL, W.J. Cryptococcal meningitis after unusual exposures to birds. **The New England Journal of Medicine**, v.328, p.1354-51, 1993.

FILIÚ, W.F.O.F.; WANKE, B.; AGÜENA, S.M.; VILELA, V.O.; MACEDO, R.C.L.; LAZERA, M. Cativeiro de aves como fonte de *Cryptococcus neoformans* na cidade de

Campo Grande, Mato Grosso de Sul, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.35, n.6, p.591-95, 2002.

FLATLAND, B.; GREENE, R.T.; LAPPIN, M.R. Clinical and serologic of cats with cryptococcosis. **Journal of American Veterinary Association**, v.209, n.6, p.1110-3, 1996.

FORTES, S.T. **Fontes sapróbias e sexualidade de isolados clínicos e ambientais de *Cryptococcus (Filobasidiella) neoformans* no estado de Roraima – Brasil**. Rio de Janeiro, 2001. 95 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária) – Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ.

FRANZOT, S.P.; HAMDAN, J.S.; CURRIE, B.P.; CASADEVALL, A. Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* in Brazil and the United States: evidence for both local genetic differences and a global clonal population structure. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, n.9, p.2243-51, 1997.

FRANZOT, S.P.; SALKIN, I.F.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, p.838-40, 1999.

FRASER, J.A.; SUBARAN, R.L.; NICHOLS, C.B.; HEITMAN, J. Recapitulation of the sexual cycle of the primary fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*: implications for an outbreak on Vancouver Island, Canada. **Eukaryotic Cell**, v.2, n.5, p.1036-45, 2003.

GLAVITS, R.; IVANICS, E.; MUNCZ, F. An outbreak of cryptococcosis in domestic poultry and its pathological significance. **Magyar Allatorvosok Lapja**, v.43, p.709-11, 1988.

GRANADOS, D.P.; CASTAÑEDA, E. Isolation and characterization of *Cryptococcus neoformans* varieties recovered from natural sources in Bogotá, Colombia, and study of ecological conditions in the area. **Microbial Ecology**, v.49, p. 282-90, 2005.

GREENLEE, P.G.; STEPHENS, E. Meningeal cryptococcosis and congestive cardiomyopathy in a ferret. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.184, n.7, p.840-1, 1984.

GRINER, L.A.; WALCH, H.A. Cryptococcosis in columbiformes at the San Diego Zoo. **Journal of Wildlife Disease**, v.14, p.389-94, 1978.

HAMIR, A.N.; SONN, R.J.; MILLER, J.M. Meningoencephalitis and pneumonia associated with *Cryptococcus neoformans* infection in a free-ranging elk in the USA. **Veterinary Record**, v.151, p.332-3, 2002.

HILL, F.I.; WOODGYER, A.J.; LINTOTT, M.A. Cryptococcosis in a North Island Brown kiwi (*Apteryx australis mantelli*) in New Zealand. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v.33, p.305-9, 1995.

HORTA, J.A.; STAATS, C.C.; CASALI, A.K.; RIBEIRO, A.M.; SCHRANK, I.S.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. Epidemiological aspects of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. **Medical Mycology**, v.40, n.6, p.565-71, 2002.

IGREJA, R.P.; LAZÉRA, M.S.; WANKE, B.; GALHARDO, M.C.G.; KIDD, S.E.; MEYER, W. Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients of the Brazilian city, Rio de Janeiro. **Medical Mycology**, n.42, p.229-38, 2004.

IKEDA, R.; SUGITA, T.; JACOBSON, E.S.; SHINODA, T. Laccase and melanization in clinically important *Cryptococcus* species other than *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.4, p.1214-8, 2002.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Cidades**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>> Acesso em 18 jul. 2006.

INSTITUTO BRASILEIRO DE OPINIÃO PÚBLICA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa de opinião pública – RENTAS, 2005.** Disponível em: <http://www.ibope.com.br/opiniao_publica/downloads/opp028_rentas_mai05.pdf> Acesso em 20 fev. 2006.

JUNGERMAN, P.F.; SCHWARTZMAN, R.M. **Veterinary Medical Mycology.** Philadelphia: Lea & Febiger, 1972. 200 p.

KERL, M.E. Update on canine and feline fungal diseases. **The Veterinary Clinics Small Animal Practice**, v.33, p.721-47, 2003.

KIELSTEIN, P.; HOTZEL, H.; SCHMALRECK, A.; KHASCHABI, D.; GLAWISCHNIG, W. Occurrence of *Cryptococcus* spp. in excreta of pigeons and pet birds. **Mycoses**, v.43, p.7-15, 2000.

KNOW-CHUNG, K.J. The discovery of creatinine assimilation in *Cryptococcus neoformans*, and subsequent work on the characterization of the two varieties of *C. neoformans*. **Zentralblatt fuer Bakteriologie**, v.275, n.3, p.390-3, 1991.

KNOW-CHUNG, K. J.; BENNETT, J.E. Epidemiologic differences between the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. **American Journal of Epidemiology**, v.120, n.1, p.123-30, 1984.

KNOW-CHUNG, K. J.; BENNETT, J.E. **Medical Mycology.** Philadelphia: Lea e Figiber, 1992. 866p.

KNOW-CHUNG, K.J.; BOEKHOUT, T.; FELL, J.W.; DIAZ, M. (1557) Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellomycetidae). **Taxon**, v.51, p.804-6, 2002.

KNOW-CHUNG, K.J.; POLACHECK, I.; BENNETT, J.E. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotype A and D) and

Cryptococcus neoformans var. *gattii* (serotype B and C). **Journal of Clinical Microbiology**, v.15, n.3, p.535-7, 1982.

KOBAYASHI, C.C.B.A.; HASIMOTO E SOUZA, L.K.; FERNANDES, O.F.L.; BRITO, S.C.A.; SILVA, A.C.; SOUSA, E.D.; SILVA, M.R.R. Characterization of *Cryptococcus neoformans* isolated from urban environmental sources in Goiânia, Goiás, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.47, n.4, p.203-7, 2005.

KONEMAN, E.W.; ROBERTS, G.D. **Practical Laboratory Mycology**. 3. ed. Baltimore: Williams e Wilkins, 1985. 210 p.

KROCKENBERGER, M.B.; CANFIELD, P.J.; MALIK, R. *Cryptococcus neoformans* in the koala (*Phascolarctos cinereus*): colonization by *C. n. var. gattii* and investigation of environmental sources. **Medical Mycology**, v.40, p.263-72, 2002.

LACÁZ, C.S. **Micologia Médica**: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico. São Paulo: Sarvier, 1991. 695 p.

LACAZ, C.S.; RODRIGUES, M.C. Sorotipagem do *Cryptococcus neoformans*. **Revista Brasileira de Medicina**, v.40, p.297-300, 1983.

LAGROU, K.; VAN ELDERE, J.; KEULEERS, S.; HAGEN, F.; MERCKX, R.; VERHAEGEN, J.; PEETERMANS, W.E.; BOEKHOUT, T. Zoonotic transmission of *Cryptococcus neoformans* from a magpie to an immunocompetent patient. **Journal of Internal Medicine**, v.257, p.385-8, 2005.

LARSSON, C.E. Criptococose felina: aspectos clínico-epidemiológicos. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICOLOGIA SOBRE MICOSES ANIMAIS, 1., 2000, Porto Alegre. **Resumos...** Porto Alegre: Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, 2000. p.72.

LAZÉRA, M.S.; CAVALCANTI, M.A.S.; TRILLES, L.; NISHIKAWA, M.M.; WANKE, B. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* – evidence for a natural habitat related to decaying wood in a pottery tree hollow. **Medical Mycology**, v.36, p.119-22, 1998.

LAZÉRA, M.S.; PIRES, F.D.A.; CAMILLO-COURA, L.; NISHIKAWA, M.M.; BEZERRA, C.C.F.; TRILLES, L.; WANKE, B. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in decaying wood forming hollows in living trees. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v.34, p.127-31, 1996.

LAZÉRA, M.S.; SALMITO CAVALCANTI, M.A.; LONDERO, A.T.; TRILLES, L.; NISHIKAWA, M.M.; WANKE, B. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. **Medical Mycology**, v.38, p.379-83, 2000.

LAZÉRA, M.S.; WANKE, B.; NISHIKAWA, M.M. Isolation of both varieties of *Cryptococcus neoformans* from saprophytic sources in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v.31, p.449-54, 1993.

LENGELER, K.B.; COX, G.M.; HEITMAN, J. Serotype AD strains of *Cryptococcus neoformans* are diploid or aneuploid and are heterozygous at the mating-type locus. **Infection and Immunity**, v.69, p.115-22, 2001.

LITVINTSEVA, A.P.; KESTENBAUM, L.; VILGALYS, R.; MITCHELL, T.G. Comparative analysis of environmental and clinical populations of *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.2, p.556-64, 2005.

LOPES, J.O.; COSTA, J.M.; STREHER, L.A.; CLOCK, C.; PINTO, M.S.; ALVES, S.H. Criptococose não associada à AIDS no Rio Grande do Sul: relato de oito casos e revisão da literatura sul-riograndense. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.30, n.5, p.369-72, 1997.

MAACK, R. **Geografia física do estado do Paraná**. 20. ed. Curitiba: Imprensa Oficial do Paraná, 2002.

MACHADO, C.C.; AMARAL, A.A.; SEVERO, L.C. *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* isolado do solo. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.35, n.1, p.77-9, 1993.

MALIK, R.; DILL-MACKY, E. MARTIN, P.; WIGNEY, D.I.; MUIRS, D.B.; LOVE, D.N. Cryptococcosis in dogs: a retrospective study of 20 consecutive cases. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v.33, p.291-7, 1995.

MALIK, R.; KROCKENBERGER, M.B.; CROSS, G.; DONELEY, R.; MADILL, D.N.; BLACK, D.; MCWHIRTER, P.; ROZENWAX, A.; ROSE, K.; ALLEY, M.; FORSHAW, D.; RUSSEL-BROWN, I.; JOHNSTONE, A.C.; MARTIN, P.; O'BRIEN, C.R.; LOVE, D.N. Avian cryptococcosis. **Medical Mycology**, v.41, p.115-24, 2003.

MALIK, R.; SPEED, B.R.; KALDOR, J.; CAIRNS, B.; PEGORER, M.; WIGNEY, D.I.; LOVE, D.N. Serum antibody response to *Cryptococcus neoformans* in cats, dogs and koalas with and without active infection. **Medical Mycology**, v.37, p.43-51, 1999.

MALIK, R.; WIGNEY, D.I.; MUIR, D.B.; LOVE, D.N. Asymptomatic carriage of *Cryptococcus neoformans* in the nasal cavity of dogs and cats. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v.35, p.27-31, 1997.

MANCIANTI, F.; NARDONI, S.; CECCHERELLI, R. Occurrence of yeasts in psittacines droppings from captive birds in Italy. **Mycopathologia**, v.153, p.121-4, 2001.

MEDLEAU, L.; MARKS, M.A.; BROWN, J.; BORGES, W.L. Clinical evaluation of a cryptococcal antigen latex agglutination test for diagnosis of cryptococcosis in cats. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.196, n.9, p.1470-3, 1990.

MENDONÇA, F. A. Abordagem interdisciplinar da problemática ambiental urbanametropolitana: esboço metodológico da experiência do Doutorado em MA&D da UFPR sobre a RMC – Região Metropolitana de Curitiba. **Revista de Meio Ambiente e Desenvolvimento - Cidade e Ambiente Urbano. Publicação**

quadrimestral do Programa de Doutorado em Meio Ambiente e Desenvolvimento da UFPR, n. 3, p. 79-95, 2001.

MEYER, W.; CASTAÑEDA, A.; JACKSON, S.; HUYNH, M.; CASTAÑEDA, E. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. **Emerging Infectious Disease**, v.9, n.2, p.189-95, 2003.

MEYER, W.; MARSZEWSKA, K.; AMIRMOSTOFIAN, M.; IGREJA, R.P.; HARDTKE, C.; METHLING, K.; VIVIANI, M.A.; CHINDAMPORN, A; SUKROONGREUNG, S.; JOHN, M.A.; ELLIS, D.H.; SORRELL, T.C. Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic DNA – a pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. **Electrophoresis**, v.20, p.1790-9, 1999.

MICALIZZI, C.; PERSI, A.; PARODI, A. Primary cutaneous cryptococcosis in an immunocompetent pigeon keeper. **Clinical and Experimental Dermatology**, v.22, p.195-71, 1997.

MILLER, W.G.; PADHYE, A.A.; van BONN, W.; JENSEN, E.; BRANDT, M.E.; RIDGWAY, S.H. Cryptococcosis in a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) caused by *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.2, p.721-4, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. **Dados e pesquisa em DST e AIDS. Coordenação do programa nacional de DTS/AIDS**. Brasília, 2002. Disponível em: <www.aids.gov.br> Acesso em: 20 fev. 2006.

MITCHELL, T.G.; PERFECT, J.R. Cryptococcosis in the era of AIDS – 100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.8, n.4, p. 515-48, 1995.

MONTENEGRO, H.; PAULA, C.R. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* and *C. neoformans* var. *neoformans* in the city of São Paulo, Brazil. **Medical Mycology**, v.38, p.385-90, 2000.

MOREIRA, T.A.; FERREIRA, M.S.; RIBAS, R.M.; BORGES, A.S. Criptococose: estudo clínico-epidemiológico, laboratorial e das variedades do fungo em 96 pacientes. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.39, n.3, p.255-258, 2006.

NIGRO, N.T.M.R.C.; PEREIRA, A.D.; HUGGINS, D.W.; LACAZ, C.S. Isolamento de *Cryptococcus neoformans* de fezes de pombos, do solo e ninhos de pombos. **Revista Brasileira de Medicina**, v.44, n.1 e 2, p.6-9, 1987.

NISHIKAWA, M.M.; LAZÉRA, M.S.; BARBOSA, G.G.; TRILLES, L.; BALASSIANO, B.R.; MACEDO, R.C.L.; BEZERRA, C.C.F.; PÉREZ, M.A.; CARDARELLI, P.; WANKE, B. Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolated from clinical and environmental sources in Brazil: Analysis of host and regional patterns. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.1, p.73-7, 2003.

NOSANCHUK, J.D.; SHOHAM, S.; FRIES, B.C.; SHAPIRO, D.S.; LEVITZ, S.M.; CASADEVALL, A. Evidence of zoonotic transmission of *Cryptococcus neoformans* from a pet cockatoo to an immunocompromised patient. **Annals of Internal Medicine**, v.132, n.3, p. 205-208, 2000.

OHKUSU, M.; TANGONAN, N.; TAKEO, K.; KISHIDA, E.; OHKUBO, M.; AOKI, S.; NAKAMURA, K.; FUJII, T.; SIQUEIRA, I.C.; MACIEL, E.A.P.; SAKABE, S.; ALMEIDA, G.M.D.; HEINS-VACCARI, E.M.; LACAZ, C.S. Serotype, mating type and ploidy of *Cryptococcus neoformans* strains isolated from patients in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.44, n.6, p.299-302, 2002.

OLIVEIRA, M.T.B.; BOEKHOUT, T.; THEELEN, B.; HAGEN, F.; BARONI, F.A.; LAZÉRA, M.S.; LENGELER, K.B.; HEITMAN, J.; RIVERA, I.N.G.; PAULA, C.R.

Cryptococcus neoformans shows a remarkable genotypic diversity in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.3, p.1356-9, 2004.

PAL, M. Natural occurrence of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in wooden canary cages. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.12, p.93-4, 1995.

PAPPALARDO, M.C.S.M.; MELHEM, M.S.C. Cryptococcosis: a review of the Brazilian experience for the disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.45, n.6, p.299-305, 2003.

PASSONI, L.F.C.; WANKE, B.; NISHIKAWA, M.M.; LAZÉRA, M.S. *Cryptococcus neoformans* isolated from human dwellings in Rio de Janeiro, Brazil: an analysis of the domestic environment of AIDS patients with and without cryptococcosis. **Medical Mycology**, v. 36, p.305-311, 1998.

POETA, M. del.; TOFFALETTI, D.L.; RUDE, T.H.; DYKSTRA, C.C.; HEITMAN, J.; PERFECT, J.R. Topoisomerase is essential in *Cryptococcus neoformans*: role in pathobiology and as an antifungal target. **Genetics**, v.152, p.167-78, 1999.

QUEIROZ-TELLES, F.; NASSIF, A.E.; MURO, M.D.; VARGAS, C.H.B.; FERNANDES-BORDIGNON, G. Tentativa de isolamento de *Cryptococcus neoformans*, a partir de fontes ambientais da região metropolitana de Curitiba, Paraná, Resultados Preliminares. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICOLOGIA, 2., 1998, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: Fiocruz, 1998. p.107.

QUINTERO, E.; CASTAÑEDA, E.; RUIZ, A. Distribución ambiental de *Cryptococcus neoformans* en el departamento de Cundinamarca – Colômbia. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.22, p.93-8, 2005.

RAIDAL, S.R.; BUTLER, R. Chronic rhinosinusitis and rhinopharyngeal destruction in a Major Mitchell's cockatoo (*Cacatua leadbeateri*) due to *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v.15, p.121-5, 2001.

RASO, T.F.; WERTHER, K.; MIRANDA, E.T.; MENDES-GIANNINI, M.J.S. Cryptococcosis outbreak in psittacine birds in Brazil. **Medical Mycology**, v.42, p.355-62, 2004.

REDE NACIONAL DE COMBATE AO TRÁFICO DE ANIMAIS SILVESTRES. **Primeiro relatório nacional sobre tráfico da fauna silvestre**, 2001. Disponível em: <http://www.renctas.org.br/pt/trafico/rel_renctas.asp> Acesso em 20 fev. 2006.

ROSARIO, I.; HERMOSO DE MENDONZA, M.; DÉNIZ, S.; SORO, G.; ÁLAMO, I.; ACOSTA, B. Isolation of *Cryptococcus* species including *C. neoformans* from cloaca of pigeons. **Mycoses**, n.48, p.421-4, 2005.

ROSSKOPF, W.J.; WOERPEL, R.W. Cryptococcosis in a thick-billed parrot. **Avian/Exotic Practice**, v.1, p.14-8, 1984.

ROZENBAUM, R.; GONÇALVES, A.J. Clinical epidemiological study of 171 cases of cryptococcosis. **Clinical Infectious Diseases**, v.18, n.3, p.369-80, 1994.

ROZENBAUM, R.; GONÇALVES, A.J.R.; WANKE, B.; CAIUBY, M.J.; CLEMENTE, H.; LAZÉRA, M.S.; MONTEIRO, P.C.F.; LONDERO, A.T. *Cryptococcus neoformans* varieties as agents of cryptococcosis in Brazil. **Mycopathologia**, v.119, p.133-6, 1992.

RUIZ, A.; VÉLEZ, D.; FROMTLING, R.A. Isolation of saprophytic *Cryptococcus neoformans* from Puerto Rico: distribution and variety. **Mycopathologia**, v.106, p.167-70, 1989.

SHIELDS, A.; AJELLO, L. Medium for selective isolation of *Cryptococcus neoformans*. **Science**, v.151, p.208-9, 1966.

SHRESTHA, R.K.; STOLLER, J.K.; HONARI, G.; PROCOPI, G.W.; GORDON, S.M. Pneumonia due to *Cryptococcus neoformans* in a patient receiving infliximab:

possible zoonotic transmission from a pet cockatiel. **Respiratory Care**, v.49, n.6, 2004.

SICK, H. **Ornitologia brasileira**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997. 912 p.

SIDRIM, J.J.C.; MOREIRA, J.L.B. Diagnóstico laboratorial das leveduras. In: SIDRIM, J.J.C.; MOREIRA, J.L.B. **Fundamentos clínicos e laboratoriais de micologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p.76-89.

SILVA, M.E.; PAULA, L.A. Isolamento de *Cryptococcus neoformans* de excremento e ninhos de pombos (*Columba livia*) em Salvador, Bahia (Brasil). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.5, p.9-11, 1963.

SOARES, M.C.B.; PAULA, C.R.; DIAS, A.L.T.; CASEIRO, M.M.; COSTA, S.O.P. Environmental strains of *Cryptococcus neoformans* variety *grubii* in the city of Santos, SP, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.47, n.1, p.31-6, 2005.

SORRELL, T.C. *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. **Medical Mycology**, v.39, p. 155-68, 2001.

SORRELL, T.C.; ELLIS, D.H. Ecology of *Cryptococcus neoformans*. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.14, p.42-3, 1997.

SPEED, B.; DUNT, D. Clinical and host differences between infections with the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. **Clinical Infectious Disease**, v.21, n.1, p.28-34, 1995.

STAIB, F. *Cryptococcus neoformans* in canaries. **Archiv fur Hygiene Bakteriologie**, v.185, p.129-34, 1962 (a).

STAIB, F. *Cryptococcus neoformans* und *Guizotia abyssinica* (syn. *G. oleifera* D.C.). **Zeitschrift fur Hygiene**, v.148. p.446-75, 1962 (b).

STAIB, F. New concepts in the occurrence and identification of *Cryptococcus neoformans*. **Mycopathologia**, v.19, p.143-5, 1963.

STAIB, F. Pathogenic fungi in human dwellings. **Mycoses**, v.35, p.11-2, 1992.

STAIB, F.; SCHULTZ-DIETERICH, J. *Cryptococcus neoformans* in fecal matter of birds kept in cages- control of *C. neoformans* habitats. **Zentralblatt Bakteriologie Mikrobiologie Hygiene**, serie B, v.179, n.2, p.179-86, 1984.

SWINNE, D.; DEPPNER, M.; LAROCHE, R.; FLOCH, J.J.; KADENDE, P. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from houses of AIDS-associated cryptococcosis patients in Bujumbura (Burundi). **AIDS**, v.3, p.389-90, 1989.

SWINNE-DESGAIN, D. *Cryptococcus neoformans* of saprophytic origin. **Sabourandia**, v.13, p.303-8, 1975.

TAKESHITA, K.; FENWICK, B.; WONG, A. Cryptococcosis in captive cockatoos. In: ANNUAL MEETING OF THE ASSOCIATION OF AVIAN VETERINARIANS, 1986, Miami. **Proceedings**...Miami: E. Northport, 1986. p.133-7.

TAY, S.T.; CHAI, H.C.; NA, S.L.; HAMIMAH, H.; ROHANI, M.Y.; SOO-HOO, T.S. The isolation, characterization and antifungal susceptibilities of *Cryptococcus neoformans* from bird excreta in Klang Valley, Malaysia. **Mycopathologia**, v. 159, p. 509-13, 2005.

TRILLES, L.; FERNÁNDEZ-TORRES, B.; LAZÉRA, M.S.; WANKE, B.; GUARRO, J. *In vitro* antifungal susceptibility of *Cryptococcus gattii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.10, p.4815-7, 2004.

TRILLES, L.; LAZÉRA, M.; WANKE, B.; THEELEN, B.; BOEKHOUT, T. Genetic characterization of environmental isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex from Brazil. **Medical Mycology**, v.41, p.383-90, 2003.

VARMA, A.; SWINNE, D.; STAIB, F.; BENNETT, J.E.; KWON-CHUNG, K.J. Diversity of DNA fingerprints in *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, p.1807-14, 1995.

WEGENER, H.H.; STAIB, F. Fatal cryptococcosis in a bird fancier. A clinical report on pathology, diagnosis and epidemiology of cryptococcosis. **Zentralblatt Bakteriologie Mikrobiologie Hygiene**, serie A, v.256, n.2, p.231-8, 1983.

ANEXO 1 – COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA.

ÁGAR NÍGER (STAIB, 1962b, 1963; SHIELDS e AJELLO, 1966)

Dextrose	1 g
Extrato de Níger	100 g
Ágar-ágar	20 g
Cloranfenicol	400 mg/l
Amicacina	15 mg/l

O extrato de semente de níger foi obtido misturando-se 100 g da semente com 250 ml de água destilada. Os meios foram autoclavados a 120° C por 15 min e distribuídos em placas de Petri (NIGRO *et al.*, 1987).

ÁGAR SABOURAUD

Glicose	20 g
Peptona	10 g
Ágar-ágar	18 g
Água destilada qsp (pH 5,0)	1000 ml

ÁGAR URÉIA-ÁGAR-BASE (CHRISTENSEN, 1946)

Peptona	1 g
Glicose	1 g
Cloreto de sódio	5 g
Fosfato dissódico	1,2 g
Fosfato monobásico de potássio	0,8 g
Uréia	2 g
Vermelho de fenol	0,012 g
Ágar-ágar	15 g
Água destilada qsp (pH 6,8)	1000 ml

ÁGAR SABOURAUD SUPLEMENTADO COM CLORANFENICOL E CICLOHEXIMIDA

Peptona	10 g
Glicose	20 g
Ágar	18 g
Cloranfenicol	0,05 g
Cicloheximida	0,4 g
Água destilada qsp	1000 ml

MEIO CARBONO (LACAZ, 1991)

Sulfato de amônio	5 g
Fosfato de potássio monobásico	1 g
Sulfato de magnésio	0,5 g
Ágar	20 g
Água destilada	1000 ml

MEIO NITROGÊNIO (LACAZ, 1991)

Dextrose	20 g
Fosfato de potássio monobásico	1 g
Sulfato de magnésio	0,5 g
Ágar	20 g
Água destilada	1000 ml

MEIO CANAVANINA-GLICINA-AZUL DE BROMOTIMOL (CGB) (KNOW-CHUNG *et al.*, 1982)

Solução A:

Glicina	10 g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄	1 g
Sulfato de L-canavanina	30 mg
Água destilada qsp (pH 5,6)	100 ml

Solução B:

Azul de bromotimol	0,4 g
NaOH 0,01 N	64 ml
Água destilada	36 ml

ANEXO 2 – PERFIL DE ASSIMILAÇÃO DE COMPOSTOS DE CARBONO E NITROGÊNIO DE ISOLADOS OBTIDOS A PARTIR DE EXCRETAS DE PASSERIFORMES E PSITTACIFORMES DO CETAS VIVAT FLORESTA E AVIÁRIOS DE CURITIBA.

AMOSTRA	dextrose	maltose	sacarose	lactose	inositol	melobiose	celobiose	galactose	rafinose	xilose	dulcitol	trealose	peptona	KNO ₃
2	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
4	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
5	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
6	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-
7	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
8	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-
9	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-
11	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-
19	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
20	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-
30	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
34	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
35	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-
37	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
44	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-
54	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
65	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
97	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
118	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
133	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-
134	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
136	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
137	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-

Continua

ANEXO 2 – PERFIL DE ASSIMILAÇÃO DE COMPOSTOS DE CARBONO E NITROGÊNIO DE ISOLADOS OBTIDOS A PARTIR DE EXCRETAS DE PASSERIFORMES E PSITTACIFORMES DO CETAS VIVAT FLORESTA E AVIÁRIOS DE CURITIBA.

AMOSTRA	dextrose	maltose	sacarose	lactose	inositol	melobiose	celobiose	galactose	rafinose	xilose	dulcitol	trealose	peptona	KNO ₃
138	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
141	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-
142	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-
143	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
144	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-
147	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-
148	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
149	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-
150	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-
151	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
157	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-
160	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
165	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-

NOTA: “+” = assimilação
“-” = não assimilação